

UNIVERZITA KARLOVA
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY

Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie**



Autor: **MUDr. Eva Pazourková**

Analýza volných nukleových kyselin a její potenciální klinické využití

Analysis of cell-free nucleic acids and its potential clinical application

Disertační práce

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Marie Korabečná, PhD.**

Místo a rok vypracování: **Praha, 2018**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. června 2018

MUDr. Eva Pazourková

Identifikační záznam:

PAZOURKOVÁ, Eva. Analýza volných nukleových kyselin a její potenciální klinické využití. [*Analysis of cell-free nucleic acids and its potential clinical application*] Praha, 2018. 161s, 6 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky. Vedoucí práce Korabečná, Marie.

Poděkování:

Můj dík patří především mé školitelce doc. RNDr. Marii Korabečné, PhD. za její trpělivost a vstřícnost, odborné vedení a rady a hlavně za nemalé množství entusiasmů, kterým naši práci neustále posouvá vpřed. Stejný dík patří i mému vedoucímu v laboratoři ing. Alešovi Hořínkovi, bez jehož technické i lidské podpory by bylo zvládnutí této práce prakticky nemožné.

Dále bych chtěla poděkovat všem mým spolupracovníkům v Laboratoři molekulární genetiky na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN. Jejich všestranná pomoc i skvělá atmosféra, kterou každodenně v práci vytvářejí, byly pro mě velkou oporou. Zejména bych chtěla poděkovat svým studentským kolegyním Mgr. Ivetě Svobodové, Mgr. Šárce Pospíšilové a Mgr. Leně Obeidové a našim nepřekonatelným laborantkám Monice Škodové a Martině Řezníčkové. Velký dík patří samozřejmě i vedoucí naší laboratoře ing. Jitce Štekrové a přednostovi našeho ústavu prof. MUDr. Ondřejovi Šedovi, PhD., kteří mi umožnili vypracování všech studií na jejich pracovišti. Nemalý dík patří také prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc., který stál u začátku mého postgraduálního studia a velkou měrou se zasloužil o vznik značné části mé práce.

Zřejmě největší poděkování potom patří doc. MUDr. Miladě Kohoutové, CSc., doc. MUDr. Alici Baxové, CSc. a prim. MUDr. Jaroslavu Kotlasovi, kteří mě v prvním ročníku studia medicíny nadchli pro molekulární biologii a genetiku vůbec a díky nimž jsem se na tuto cestu vydala.

A závěrem bych chtěla vyjádřit obrovský dík všem členům své rodiny, kteří museli při mém studiu prokázat velkou trpělivost a přes všechny těžkosti se mnou vydrželi.

Abstrakt

Tato práce se zabývá výzkumem volných nukleových kyselin (cfNA). V první části práce jsou prezentovány změny metylací promotorů genů spojených se zánětlivou a imunitní odpovědí organismu v průběhu hemodialýzy. I v tak krátkém časovém intervalu lze v plazmě detekovat změny metylačního profilu u některých genů. Byly prokázány změny u genů, které hrají roli v regulaci hematopoézy, a jejich souvislost s potřebou terapie anémie. Další studie cfNA zkoumala zastoupení miRNA v plazmě u pacientů s AML před léčbou a po léčbě. Výsledkem této studie je identifikace 6 miRNA, které jsou v době zachytu onemocnění u pacientů zvýšené a po úspěšné léčbě v první remisi se jejich hladiny snižují. Přítomnost cfNA je detekovatelná také v moči. Při výzkumu vhodného neinvazivního markeru karcinomu močového měchýře byly zjištěny zvýšené hladiny cfDNA v moči u pacientů. Dále bylo nalezeno 5 miRNA, jejichž hladiny jsou při onemocnění karcinomem sníženy. Zároveň bylo určeno spektrum miRNA, které se vyskytují v moči všech osob bez ohledu na pohlaví, věk a zdravotní stav osoby. Specifickou částí je práce s volnou fetální DNA (cffDNA). Analýzou cffDNA je u nás rutinně určováno RhD plodu z krve matky. Testovali jsme možnost této diagnostiky novou metodou droplet digital PCR. Bylo zjištěno, že tato metoda dosahuje stejně dobrých výsledků jako standardně prováděné real-time PCR, vykazuje menší variabilitu technických replikátů, ovšem má složitější pracovní postup. Hladiny cffDNA byly analyzovány také u gravidních pacientek s antifosfolipidovým syndromem. U nich nebyly zjištěny žádné odchylky oproti zdravým těhotným, zřejmě z důvodu dobré kompenzace a залéčenosti onemocnění.

Klíčová slova: volné nukleové kyseliny, metylace promotorů genů, imunitní odpověď, hemodialýza, akutní myeloidní leukémie, karcinom močového měchýře, volná fetální DNA, digital droplet PCR, RhD inkompatibilita, antifosfolipidový syndrom

Abstract

This work presents the results of our research of cell-free nucleic acids (cfNA). The first part shows changes in methylation patterns of immune response genes promoters that are detectable in plasma during the hemodialysis sessions and also differences in methylation between patients and healthy subjects. Alterations include genes that play their role in the regulation of hematopoiesis and these changes are in close relation with the need of anemia therapy. In the other plasma cfNA study we detected miRNA signatures in patients with acute myeloid leukemia at diagnosis (6 highly abundant miRNAs found) and in remission achieved after standard chemotherapy (trend to normalization, lower levels of these miRNAs). Another part of work presents data from the study of potential non-invasive biomarker of bladder cancer. The amounts of cfDNA in urine are higher in patients than in healthy subjects and there were found 5 down-regulated miRNAs. Simultaneously it was established set of 30 miRNAs that are constantly present in urine supernatants independently on sex, age and healthy status of subjects. The last part presents analysis of cell-free fetal DNA. We analyzed differences between a new quantification method - droplet digital PCR and real-time PCR which is used routinely nowadays. Slightly more precise was found ddPCR. Shortly is mentioned a study that compares levels of cfDNA in pregnant patients with antiphospholipid syndrome with healthy women. There were no differences found.

Key words: cell-free nucleic acids, methylation of promoters of genes, immune response, hemodialysis, acute myeloid leukemia, bladder cancer, cell-free fetal DNA, digital droplet PCR, RhD incompatibility, antiphospholipid syndrome

Obsah

1	Úvod k disertační práci.....	9
2	Teoretická část – úvod do problematiky.....	10
3	Volné nukleové kyseliny v plazmě.....	13
3.1	Onemocnění ledvin a hemodialýza (HD).....	13
3.1.1	Předpoklady a cíle studie.....	13
3.1.2	Teoretický úvod.....	14
3.1.2.1	Chronická renální insuficience.....	14
3.1.2.2	Hemodialýza a cfDNA.....	14
3.1.2.3	Anémie u nefrologických pacientů.....	15
3.1.3	Metodika.....	15
3.1.4	Výsledky.....	16
3.1.5	Diskuse.....	21
3.1.6	Závěr.....	22
3.1.7	Příloha 1 – články.....	23
3.1.7.1	Alterations in methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA during a hemodialysis procedure.....	23
3.1.7.2	Methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA differs in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy according to the intensity of anemia therapy.....	32
3.1.7.3	Cell-free nucleic acids as biomarkers in dialyzed patients.....	40
3.2	Akutní myeloidní leukémie.....	49
3.2.1	Předpoklady a cíle studie.....	49
3.2.2	Teoretický úvod.....	49
3.2.2.1	AML.....	49
3.2.2.2	miRNA u AML.....	50
3.2.3	Metodika.....	50
3.2.4	Výsledky.....	51
3.2.5	Diskuse.....	54
3.2.6	Závěr.....	55
3.2.7	Příloha 2 – článek.....	56
3.2.7.1	The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients	56
4	Volné nukleové kyseliny v moči.....	64
4.1	Karcinom močového měchýře.....	64
4.1.1	Předpoklady a cíle studie.....	64
4.1.2	Teoretický úvod.....	64
4.1.2.1	Karcinom močového měchýře.....	64
4.1.2.2	cfDNA v moči.....	66

4.1.2.3	miRNA v moči u karcinomu močového měchýře.....	68
4.1.3	První část studie – výzkum cfDNA.....	69
4.1.3.1	Metodika.....	69
4.1.3.2	Výsledky.....	70
4.1.3.3	Diskuse.....	72
4.1.4	Druhá část studie – výzkum miRNA.....	73
4.1.4.1	Metodika.....	73
4.1.4.2	Výsledky.....	75
4.1.4.3	Diskuse.....	77
4.1.5	Závěr.....	80
4.1.6	Příloha 3 – články.....	81
4.1.6.1	Urinary cell-free DNA quantification as non-invasive biomarker in patients with bladder cancer.....	81
4.1.6.2	Comparison of microRNA content in plasma and urine indicates the existence of a transrenal passage of selected microRNAs.....	89
4.1.6.3	MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection.....	94
5	Volné nukleové kyseliny v těhotenství.....	106
5.1	Neinvazivní prenatální diagnostika RhD plodu.....	106
5.1.1	Předpoklady a cíle studie.....	106
5.1.2	Teoretický úvod.....	106
5.1.2.1	Fetální volná DNA.....	106
5.1.2.2	RhD inkompatibilita.....	108
5.1.2.3	Droplet PCR.....	109
5.1.3	Metodika.....	109
5.1.4	Výsledky.....	111
5.1.4.1	Porovnání výsledků obou metod při použití standardní DNA.....	111
5.1.4.2	Porovnání výsledků obou metod na klinických vzorcích.....	111
5.1.5	Diskuse.....	114
5.1.6	Závěr.....	115
5.1.7	Příloha 4 – článek.....	116
5.1.7.1	Performance of droplet digital PCR in non-invasive fetal RHD genotyping – comparison with a routine real-time PCR based approach.....	116
5.2	Antifosfolipidový syndrom.....	130
5.2.1	Předpoklady a cíle studie.....	130
5.2.2	Teoretický úvod.....	130
5.2.2.1	Antifosfolipidový syndrom.....	130
5.2.2.2	APS a těhotenství.....	131
5.2.3	Metodika.....	132
5.2.4	Výsledky.....	132
5.2.5	Diskuse.....	133
5.2.6	Závěr.....	134
5.2.7	Příloha 5 – článek.....	135

5.2.7.1	Quantification of circulating fetal DNA as a tool for potential monitoring of pregnant patients with antiphospholipid antibodies.....	135
6	Závěrečné shrnutí.....	142
7	Seznam použité literatury.....	144
8	Seznam zkratek.....	158
9	Seznam publikací autorky.....	161

1 Úvod k disertační práci

V rámci svého postgraduálního studia jsem se zabývala výzkumem volných nukleových kyselin, a to u pacientů s různými onemocněními, u zdravých osob a u těhotných žen s fyziologickými i patologickými graviditami.

V úvodu práce jsou základní informace týkající se volných nukleových kyselin (cfNA), zvláště DNA a miRNA. Následují kapitoly zabývající se jednotlivými více či méně samostatnými studiemi, na kterých jsem se v průběhu svého studia podílela. V závěru každé kapitoly jsou přiloženy publikace, které z těchto studií vzešly.

Nejprve představuji výsledky výzkumu cfNA v plazmě. Jedná se především o výzkum u hemodialyzovaných pacientů s různými onemocněními ledvin. Jedna samostatná studie se potom týká pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Poté jsou zařazeny výsledky analýz cfNA v moči se zvláštním zřetelem k pacientům s karcinomem močového měchýře. V závěru uvádím studie vycházející původně z mé rutinní praxe v prenatální diagnostice. Jedná se o výzkum RhD plodu relativně novou metodou droplet digital PCR (ddPCR) a výzkum obsahu cfNA u gravidních pacientek s antifosfolipidovým syndromem (APS).

2 Teoretická část – úvod do problematiky

Za objevitele volné DNA (cell-free DNA, cfDNA) jsou považováni Mandel a Metais (Mandel and Metais 1948), kteří o jejím výskytu u zdravých i nemocných osob referovali poprvé již v roce 1948. Tento velice významný objev byl ovšem nejprve vědeckou komunitou značně podhodnocen a nebyla mu věnována náležitá pozornost. Teprve o téměř 20 let později, v roce 1966, se začíná s výzkum cfDNA u různých onemocnění. První mezi publikacemi tohoto zaměření je práce zabývající se výzkumem cfDNA u pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE) (Tan et al. 1966).

Přítomnost cfDNA u zdravých osob byla zkoumána Steinmanem v roce 1975 (Steinman 1975). Dle jeho závěrů měla být cfDNA přítomna pouze v séru zdravých osob, nikoli v jejich plazmě. Tyto závěry byly posléze překonány (Sorenson et al. 1994), a dnes již bezpečně víme, že cfDNA se vyskytuje i v plazmě zdravých osob. Navíc je plazma ve srovnání se sérem vhodnějším zdrojem cfDNA, neboť lépe odráží obsah cfDNA v plné krvi (Lee et al. 2001). Přítomnost cfDNA je u člověka prokázána nejen v krvi, ale i v dalších tělních tekutinách – moči, lymfě, mozkomíšním moku, mateřském mléku i v kolostru (Gahan and Swaminathan 2008).

Zároveň se začaly objevovat práce monitorující změny množství cfDNA u různých patologických i fyziologických stavů. Poprvé byla cfDNA kvantifikována za použití metody senzitivní radioimunoanalýzy založené na anti-DNA protilátkách získaných od pacientů se SLE (Leon et al. 1977). Studie prokázala 50% zvýšení hladin cfDNA v séru pacientů s nádorem oproti séru zdravých osob. Bylo prokázáno, že hladiny cfDNA stoupají například v přítomnosti zánětů, onkologických onemocnění (Ziegler et al. 2002, Esposito et al. 2014) nebo u akutního infarktu myokardu (Antonatos et al. 2006). U cévních mozkových příhod (CMP) (Rainer and Lam 2006) a polytraumat (Lo et al. 2000) korelují jejich hladiny se závažností stavu pacienta. Množství cfDNA stoupá i při stresu nebo dokonce po excesivní fyzické námaze, například po sportovním tréninku (Atamaniuk et al. 2004, Fatouros et al. 2006). Na diagnostický potenciál cfDNA se zaměřila řada studií. Významným objevem bylo v roce 1989 zjištění, že cfDNA u pacientů s karcinomem pochází z tumoru, protože jsou v ní obsaženy stejné mutace jako v nádorové tkáni (Stroun et al. 1989).

Dalším významným mezníkem ve výzkumu volných nukleových kyselin bylo nalezení volné fetální DNA v krvi matky v roce 1997 (Lo et al. 1997). Na základě tohoto zjištění se dodnes

rozdíví metody neinvazivní prenatalní diagnostiky, o kterých je pojednáno detailněji v příslušné kapitole.

Postupně bylo prokázáno, že v tělních tekutinách se nevyskytuje pouze volná DNA, ale že je v nich možno prokázat i různé druhy volné RNA, zvláště pak regulační nekódující typy RNA jako jsou dlouhé nekódující RNA (lncRNA) nebo mikroRNA (miRNA). MikroRNA jsou krátké, nejčastěji 21 - 23 nukleotidů dlouhé RNA, které se účastní regulace genové exprese (Ambros et al. 2003). Na základě komplementarity bází se vážou na úseky mRNA a vedou k jejich degradaci nebo snížení exprese genu (Wightman et al. 1993, Bartel 2009). Jsou detekovatelné v plazmě i v séru (Wang et al. 2012) a jejich profil odráží zdravotní stav a děje probíhající v organismu (Ambros 2001, Reid et al. 2011, Hromadnikova et al. 2012).

Bylo zjištěno, že volné nukleové kyseliny (NA - nucleic acids) se mohou v tělních tekutinách vyskytovat buď samostatně, většinou ve formě malých fragmentů, nebo vázané v různých nanopartikulích a mikrovezikulárních částicích typu exosomů (Gallo et al. 2012). Profil jednotlivých typů volných nukleových kyselin se v obou těchto frakcích navzájem liší a je tedy z hlediska vyhodnocení, případně porovnávání výsledků jednotlivých prací důležité věnovat zvýšenou pozornost použitým metodikám, se zvláštním zřetelem k aplikovanému typu izolace (Jarry et al. 2014).

Zvláštní kapitolou je také způsob kvantifikace miRNA. Na tomto poli neexistuje žádná obecně použitelná endogenní kontrola s neměnným obsahem v tkáních a tělních tekutinách. Často používané U6 nebo RNU6B jsou malé jaderné RNA, tedy relativně dobře využitelné v analýzách některých tkání (Lamba et al. 2014), ale nevhodné pro výzkum volné frakce v tělních tekutinách (Weber et al. 2010), kde se vyskytují v téměř nedetekovatelném množství.

Původ volných NA (cfNA) není zatím zcela objasněn. Předpokládá se jejich uvolňování z apoptotických a nekrotických buněk, ale i aktivní uvolňování živými buňkami, což ukazuje na jejich významnou úlohu v dějích probíhajících v organismu. První hypotézy předpokládaly, že cfNA jsou do oběhu uvolňovány pouze z buněk apoptotických a nekrotických. Ovšem v roce 1976 byla publikována práce Anker et al., která dokumentuje uvolňování nově syntetizované cfDNA z lymfocytů (Anker et al. 1976). Stroun et al. (Stroun et al. 2001) potom ve své studii jednoznačně prokázal uvolňování DNA z buněk v tkáňové kultuře, kde byla inhibována apoptóza. Také původní představa, že nádorově specifická DNA pochází pouze z nekrotických nádorových buněk, byla tímto překonána, a za její hlavní zdroj

je považováno aktivní uvolňování, což koresponduje s velkým množstvím této DNA v cirkulaci pacientů s onkologickým onemocněním (Jung et al. 2010).

Zpočátku nebylo o případné funkci nebo významu cfNA známo nic určitého. Postupem doby se ukázalo, že mimo jiné může sloužit horizontálnímu přenosu informací (Gahan and Stroun 2010). Ku příkladu v transplantačních pokusech bylo zjištěno, že cizorodá cfDNA má vliv na fenotyp hostitele (Gahan 2006).

V posledních letech je stále více pozornosti věnováno možnostem neinvazivní diagnostiky pomocí cfNA. Spektrum onemocnění, u kterého jsou nacházeny různě významné markery v této oblasti, se stále zvyšuje. Největší rozsah výzkumu je zcela dle očekávání v onkogenetice a druhá velice významná oblast je prenatální diagnostika, kde analýza fetálních cfNA umožňuje detekci patologií plodu bez nutnosti invazivního odběru včetně jeho rizik.

Diagnostické postupy založené na detekci cfNA jsou založeny na třech základních premisách. Za prvé se jedná o kvantitativní změny. Zpravidla nacházíme u různých patologických stavů zvýšená množství cfNA. Za druhé jsou to kvalitativní změny jako mutace a metylace nádorově specifických genů, které v plazmě a dalších tělních tekutinách nacházíme. Třetí oblastí je potom detekce metylací promotorů nádorově specifických genů, které nenacházíme u zdravých osob (Peters and Pretorius 2011). Uvedené případy se samozřejmě nemusejí nutně týkat pouze onkologických onemocnění, ale mají obecnou platnost pro mnoho patologických stavů organismu.

3 Volné nukleové kyseliny v plazmě

3.1 Onemocnění ledvin a hemodialýza (HD)

3.1.1 Předpoklady a cíle studie

Při dialýze dochází k apoptóze krevních elementů v důsledku jejich kontaktů s hemodialyzační membránou (Carracedo et al. 1995, Nahar et al. 2001) a k aktivaci prozánětlivých faktorů (Garcia Moreira et al. 2006). Z literatury víme, že hladiny cfDNA se u dialyzovaných pacientů zvyšují v průběhu celé procedury a krátce po ní klesají k původním hodnotám (Atamaniuk et al. 2006, Garcia Moreira et al. 2006, Korabecna et al. 2008). U těchto pacientů bylo ovšem vždy sledováno pouze množství DNA, nikoli změny v jejím profilu.

Cílem naší studie bylo zjistit, jestli lze detekovat změny v metylačním profilu promotorů genů spojených s imunitní a zánětlivou odpovědí organismu v relativně krátkém časovém intervalu, jakým HD je. Studium metylací promotorů genů na úrovni cfDNA a jejich alterací bylo již použito v diagnostice a odhadu prognózy, případně odpovědi na terapii, u různých onemocnění (Levenson 2010), zvláště nádorů (Anglim et al. 2008, Anglim et al. 2008, Dworkin et al. 2009, Hoque 2009), ale třeba i psychiatrických onemocnění (Urdinguio et al. 2009). Zjednodušeně lze říci, že u aktivně exprimovaných genů jsou promotory hypometylované, naopak u genů neexprimovaných nacházíme v promotorech hypermetylace. Dosud ovšem nebyla provedena žádná studie v tomto směru u nefrologických pacientů.

Poté, co jsme v první části studie prokázali, že existují rozdíly v metylačních profilech mezi pacienty před hemodialýzou a po ní (Korabecna et al. 2012), jsme náš výzkum dále rozšířili o navazující studii, ve které jsme se zaměřili na jednu skupinu pacientů se stejnou příčinou renální insuficience, konkrétně s diabetickou nefropatií. Zjistili jsme také, že jedním z alterovaných genů je *IL13*, který byl citován v souvislosti se špatnou odpovídavostí na erythropoetinovou terapii anémie. Protože anémie je u dialyzovaných pacientů velmi častou komplikací a léčebné úspěchy v této oblasti jsou různé, zaměřili jsme se i na analýzu rozdílů v metylacích promotorů genů spojených s imunitní odpovědí u skupin pacientů s dobrou a špatnou odpovědí na terapii rekombinantním erythropoetinem.

3.1.2 Teoretický úvod

3.1.2.1 Chronická renální insuficience

Při chronické renální insuficienci se postupně snižuje filtrační schopnost ledvin, které posléze nejsou schopné udržovat vnitřní homeostázu organismu. Mezi nejčastější příčiny renálního selhání patří různé chronické glomerulopatie, ať už primární jako je fokálně segmentální glomeruloskleróza (FSGS), nemoc minimálních změn (MCD) a membranózní glomerulonefritida (MGN), nebo sekundární spojené například s arteriální hypertenzí nebo diabetem (DM) (Kramer et al. 2018).

Náhrada funkce ledvin je v zásadě možná třemi způsoby. Jsou to transplantace ledvin, peritoneální dialýza a hemodialýza. Cílem je odstranění odpadních látek metabolismu, jejichž kumulace v organismu by měla toxické účinky, a snížení celkového objemu vody v těle pacienta.

3.1.2.2 Hemodialýza a cfDNA

Během HD dochází k přímému kontaktu krevních elementů s membránou dialyzátoru. Nezávisle na typu membrány (Garcia Moreira et al. 2006) použité v dialyzátoru vede tento kontakt k apoptóze leukocytů, k aktivaci komplementu a monocytů a k produkci cytokinů. Po stimulaci monocytů plazmou hemodialyzovaných pacientů v in vitro pokusu dochází k jejich aktivaci a produkci IL-6, zatímco plazma zdravých osob tuto aktivaci neindukuje (Atamaniuk et al. 2012). V konečném důsledku se tedy jedná o podobnou reakci, jaká probíhá při zánětlivé nebo hypersenzitivní odpovědi organismu.

Množství volné DNA je u HD pacientů ještě před zahájením dialýzy mírně vyšší než u zdravých kontrol. V jejím průběhu pak toto množství dále stoupá, s nejvyššími hodnotami na konci HD (Fournie et al. 1989, Atamaniuk et al. 2006, Korabecna et al. 2008). Zároveň stoupá i počet apoptotických leukocytů, které jsou považovány za hlavní zdroj zvýšeného množství cfDNA. Po ukončení procedury se zvýšené hladiny cfDNA rychle, zhruba během 30 minut, vracejí k hodnotám před dialýzou (Garcia Moreira et al. 2006). Poločas rozpadu cfDNA se zde udává asi 4 minuty (Rumore et al. 1992).

3.1.2.3 Anémie u nefrologických pacientů

Anémie je jednou z častých komplikací u chronického onemocnění ledvin. Mírné formy mohou být asymptomatické. Větší nedostatek erytrocytů způsobuje u pacientů únavu, dušnost, tachykardie, při dlouhodobě neléčené anémii se zhoršují srdeční funkce. Za tvorbu erytrocytů v kostní dřeni je odpovědný hormon erythropoetin, který je za fyziologických podmínek produkován peritubulárními buňkami ledvin. U chronických renálních onemocnění je jeho produkce snížena. Při hemodialýze dochází ke kontaktu krevních buněk s membránou dialyzátoru. Jedná se o prozánětlivý proces, na jehož základě je spuštěna produkce prozánětlivých cytokinů a je dále tlumena erythropoéza (Cooper et al. 2003, Mullarky et al. 2007). Navíc při hemodialýze malá část krve zůstává po každé proceduře v dialyzátoru, čímž dochází k pravidelným ztrátám erytrocytů a železa.

Všechny uvedené faktory se u hemodialyzovaných pacientů podílejí na rozvoji anémie, kterou je často třeba léčit rekombinantním erythropoetinem. Bohužel část pacientů na tuto terapii odpovídá pouze slabě a k dostatečnému zvýšení jejich krevetvorby je potřeba vysokých dávek léčiva (National-Kidney-Foundation 2001).

3.1.3 Metodika

V první části studie jsme analyzovali vzorky plazem 22 pacientů a 10 zdravých osob. Příčina renálního selhání u pacientů byla různá, nejčastěji se jednalo o DM (6 osob) a tubulointersticiální nefropatie (4 osoby). Vzorky byly odebírány před hemodialýzou a po jejím skončení. U zdravých osob byly vzorky odebírány v dopoledních hodinách v odstupu zhruba 4 hodin, aby byl dodržen stejný časový interval jako u dialyzovaných pacientů.

Ve druhé části studie byl rozšířen soubor pacientů s diabetickou nefropatií, neboť toto onemocnění patří mezi nejčastější příčiny renálního selhání (Kanasaki et al. 2013), na celkových 18 pacientů. Vzorky byly opět odebírány před dialýzou a po dialýze. Tito pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle potřeby terapie anémie rekombinantním erythropoetinem. V první skupině byli pacienti, kteří terapii nepotřebovali nebo dostávali pouze malé dávky léčiva, ve druhé skupině byli pacienti, kteří potřebovali vysoké dávky erythropoetinu. Kontrolní soubor byl stejný jako v předcházející části studie.

Volná DNA byla z plazmy izolována pomocí kitu QiaAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) a kvantifikována metodou real-time PCR (přístroj 7900HT Fast Real Time PCR, Life Technologies) detekcí housekeeping genu *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza).

Úroveň metylace promotorů 24 genů spojených s imunitní odpovědí organismu byla stanovena rovněž metodou real-time PCR za pomoci kitu EpiTech Methyl qPCR Array Inflammatory Response and Autoimmunity (SABiosciences, Qiagen). Metoda je založena na použití metylačně specifických restrikčních enzymů. Každý vzorek vstupuje do 4 různých reakcí a v každé z nich je měřeno finální množství DNA po jejím natrávení specifickými enzymy. První reakce je s enzymem specificky štěpícím v místech metylace, měřena je velikost nemetylované frakce (unmethylated). Druhá reakce probíhá naopak s enzymem, který štěpí DNA v místech, kde její báze nejsou metylovány, takže zůstává část DNA s metylovanými promotory (hypermethylated). Další reakce je s oběma enzymy zároveň – dvojitá reakce (tzv. double digest), ve které by mělo dojít k rozštěpení obou přítomných úseků, jak metylovaných, tak nemetylovaných. Do poslední reakce není přidáván žádný restrikční enzym a výsledek odpovídá původnímu množství DNA (tzv. mock digest). Softwarově je dopočítána zbývající část DNA (označena jako intermediately methylated). Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako relativní množství, stanovená poměrem k původnímu množství DNA, detekovaném v reakci bez restrikce. Rozdíl hodnot CT (threshold cycle) mezi dvojitou reakcí s natrávením DNA (nezávislou na stavu metylace daného úseku) a reakcí bez restrikčních enzymů by měl být vyšší než 2, což znamená, že více než 75 % molekul DNA bylo naštěpeno. Tato podmínka byla u všech našich vzorků splněna.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programů Cluster analysis (SABiosciences, Qiagen) a STATISTICA verze 10 (StatSoft).

3.1.4 Výsledky

Srovnáním vzorků pacientů před a po dialýze bylo možno sledovat změny v metylačním profilu. Bylo prokázáno, že tyto změny jsou detekovatelné i v relativně krátkém časovém intervalu 4 hodin, a to nejen u pacientů podstupujících hemodialýzu, tedy relativně razantní zásah do organismu, ale i u zdravých osob bez jakéhokoli zásahu v mezidobí mezi oběma odběry.

Statisticky významné rozdíly v metylacích promotorů byly nalezeny Wilcoxonovým testem pro párové vzorky u genů *IL7* ($p = 0,033$), *IL13* ($p = 0,003$) a *IL17C* ($p = 0,0001$) u dialyzovaných pacientů před a po HD. U všech tří těchto genů docházelo během dialýzy ke snížení metylace jejich promotorů (grafy 1 – 3).

Pro vzájemné porovnání všech čtyř skupin – pacienti před a po dialýze, zdravé osoby první a druhý odběr – byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA. Významné rozdíly byly zjištěny u genů *IL17C* ($p = 0,005$) a *TYK2* ($p = 0,005$). Zatímco u zdravých osob se úroveň metylace promotorů během čtyřhodinového intervalu spíše zvyšovala, u pacientů byl pozorován opačný trend a úroveň metylace se většinou snižovala. Tyto protichůdné tendence pak vyústily ve statisticky významné rozdíly v Mann-Whitneyově testu mezi skupinou pacientů po HD a druhým odběrem u zdravých osob u genu *IL13* ($p = 0,015$). Zároveň byl zjištěn i rozdíl v genu *TYK2* ($p = 0,001$), kde se sice hladiny u pacientů během dialýzy výrazně neměnily, ale u zdravých osob došlo během odběrového intervalu k výraznému posunu směrem k hypermetylaci promotoru (graf 4). Také mezi pacienty před dialýzou a prvním odběrem u zdravých osob byly nalezeny rozdíly a to u genů *IL17* a *IL17C* ($p = 0,028$ a $p = 0,024$).

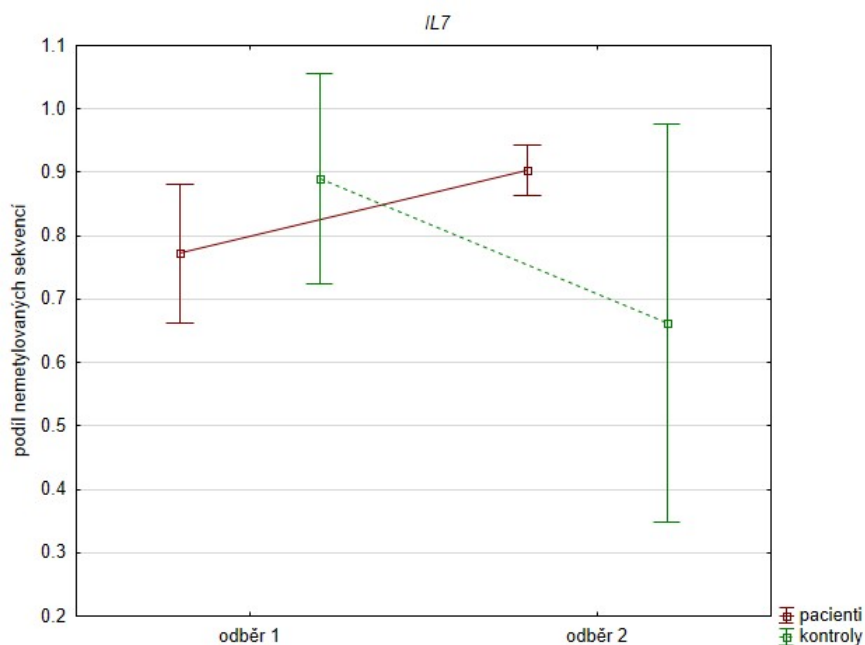
Ve druhé části studie byly porovnávány výsledky u pacientů s diabetickou nefropatií a zdravými osobami podle stejného schématu jako v předchozí fázi. Statistické porovnání Wilcoxonovým testem ukázalo významný rozdíl mezi stavem před HD a po HD pouze u genu *IL13* ($p = 0,002$). Srovnání všech 4 skupin bylo provedeno pomocí testu Kruskal-Wallisova ANOVA. Významně zvýšené procento nemetylovaných sekvencí bylo zjištěno u genů *GATA3* ($p = 0,046$), *IL13* ($p = 0,039$), *IL6R* ($p = 0,003$), *IL6ST* ($p = 0,024$), *IL7* ($p = 0,014$), *INHA* ($p = 0,003$) a *TYK2* ($p = 0,006$) u pacientů po HD oproti druhému vzorku zdravých osob (graf 5).

Použití shlukové analýzy na vzorky před HD ukázalo skupiny genů se zvýšenou metylací promotorů především u pacientů ze skupiny s malou potřebou terapie erythropoetinem (graf 6). Pacienti z druhé skupiny měli zvýšené procento nemetylovaných promotorů genů. Nejmarkantnější rozdíly jsme pozorovali u genů *IL13RA1* a *IL15*.

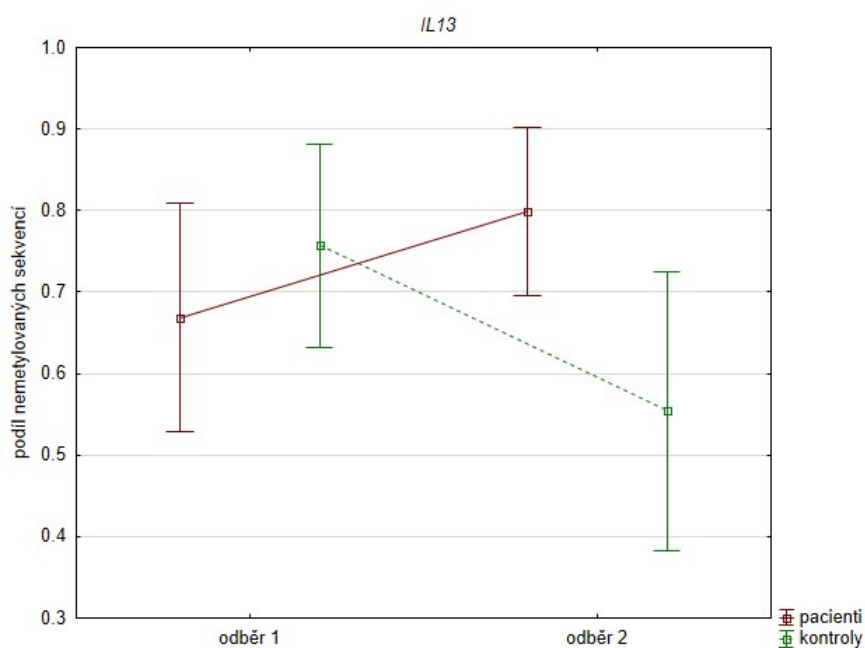
Grafy 1 - 3

Úroveň metylace promotorů genů *IL7* (graf 1), *IL13* (graf 2), a *IL17C* (graf 3) u dialyzovaných pacientů (červeně) a u zdravých osob (zeleně). Odběr 1 – u pacientů před hemodialýzou, u zdravých osob ranní odběr, odběr 2 – u pacientů po hemodialýze, u zdravých odběr 4 hodiny od prvního odběru. Osa y ukazuje podíl nemetylovaných sekvencí promotorů daných genů. Středová hodnota je průměr, svorky vyznačují 95% interval spolehlivosti.

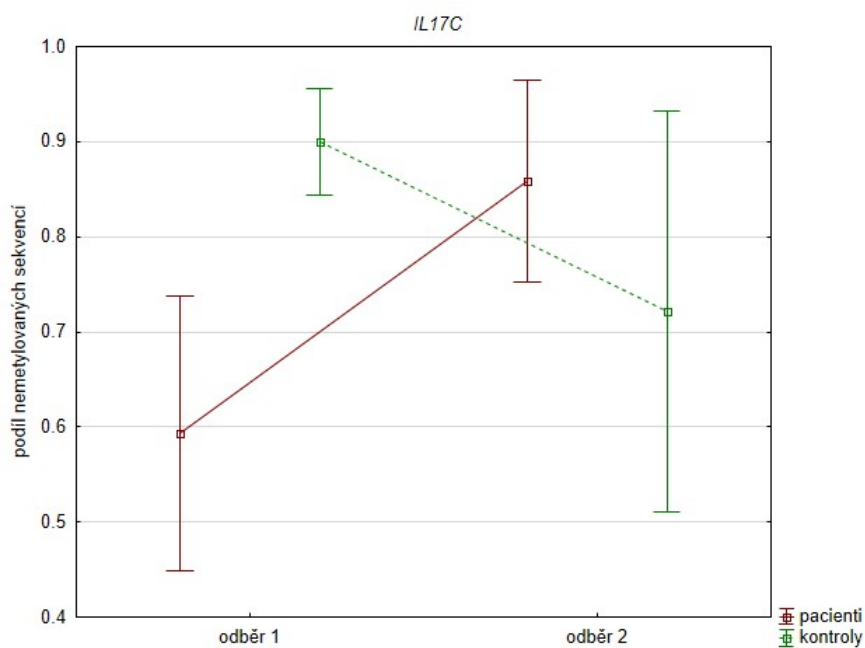
Graf 1



Graf 2

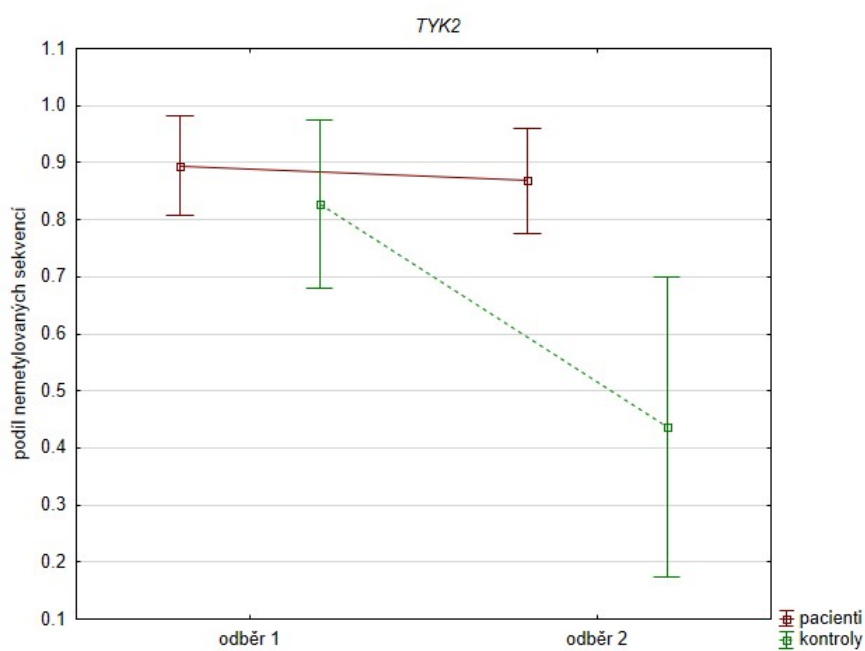


Graf 3



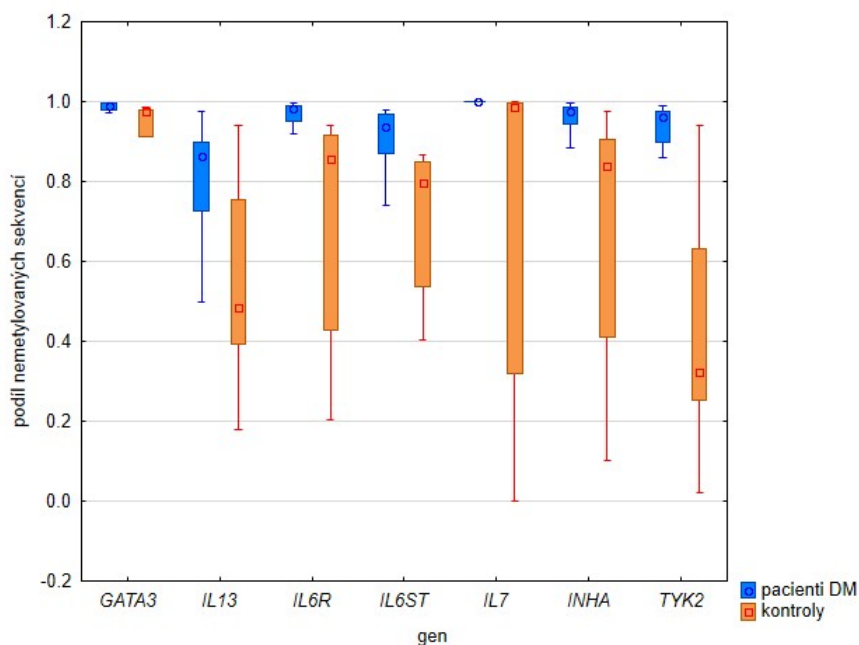
Graf 4

Úroveň metylace promotorů genu *TYK2* u dialyzovaných pacientů (červeně) a u zdravých osob (zeleně). Odběr 1 – u pacientů před hemodialýzou, u zdravých osob ranní odběr, odběr 2 – u pacientů po hemodialýze, u zdravých odběr 4 hodiny od prvního odběru. Osa y ukazuje podíl nemetylovaných sekvencí promotorů daných genů. Středová hodnota je průměr, svorky vyznačují 95% interval spolehlivosti.



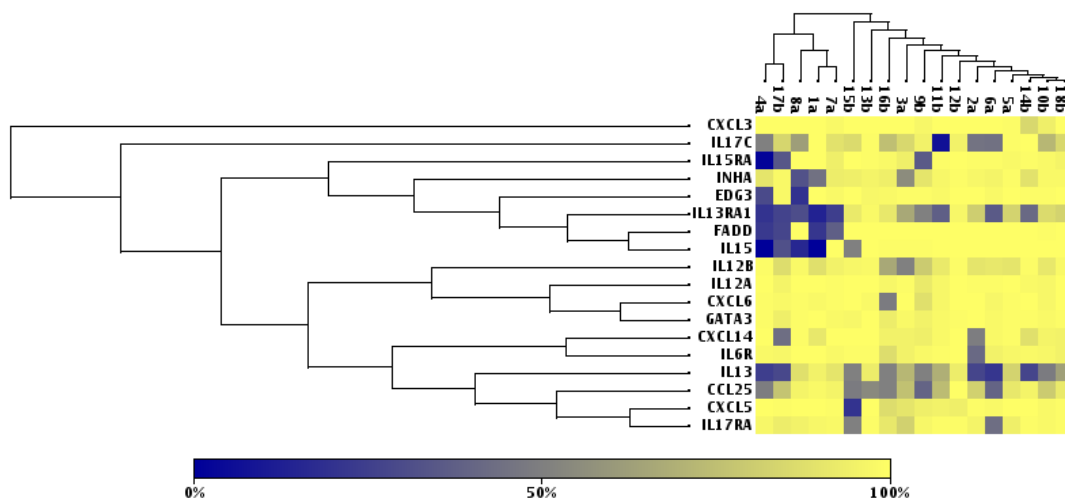
Graf 5

Úroveň metylace promotorů genů *GATA3*, *IL13*, *IL6R*, *IL6ST*, *IL7*, *INHA* a *TYK2* u dialyzovaných pacientů s DM po HD (modře) a u zdravých osob ve druhém odběru (oranžově). Osa y ukazuje podíl nemetylovaných sekvencí promotorů daných genů. Čtvereček označuje medián, box horní a dolní kvartil (25 % - 75 %), svorky rozsah neodlehých hodnot.



Graf 6

Shluková analýza nemetylovaných sekvencí promotorů zkoumaných genů u pacientů před hemodialýzou. Metoda nejvzdálenějšího souseda (complete linkage). Vzorky 1a – 8a reprezentují pacienty s nulovou nebo nízkou potřebou erythropoetinové terapie, vzorky 9b - 18b reprezentují pacienty s vysokou potřebou erythropoetinové terapie. Žlutá barva – 100 % sekvencí nemetylovaných, tmavě modrá – 0 % sekvencí nemetylovaných.



3.1.5 Diskuse

V první části studie jsme zjistili rozdíly mezi profily metylovaných promotorů genů u pacientů před HD a po ní. Změny se týkaly hlavně snížení metylace promotorů genů *IL7*, *IL13*, *IL17C* a *TYK2* v průběhu HD. Tato nižší metylace promotorů byla statisticky významná také u skupiny pacientů po HD proti zdravým osobám, opět u genů *IL13*, *IL17C* a *TYK2*.

IL-7 hraje důležitou úlohu ve vývoji a diferenciaci B- i T-lymfocytů. U T-lymfocytů stimuluje V(D)J rekombinaci jejich receptorů a podstatně ovlivňuje jejich periferní frakci (Aspinall 2006).

IL-13 je mimo jiné regulátorem erythropoézy. U dialyzovaných pacientů mohou být jeho hladiny zvýšeny v souvislosti se špatnou odpovědí na terapii erythropoetinem (Cooper et al. 2003). Je produkován především aktivovanými Th lymfocyty. Stimuluje diferenciaci B-lymfocytů (přesmyk protilátek z IgM na IgE).

IL-17C je členem rodiny IL-17, což je vysoce konzervovaná skupina proteinů s výraznou vzájemnou homologií, jejíž členové indukují expresi mnoha prozánětlivých faktorů (Kolls and Linden 2004). Jsou spojeny s rozvojem mnoha poruch imunity, včetně autoimunních chorob (Yamaguchi et al. 2007, Chang et al. 2011). Hladiny IL-17 jsou často zvýšené u pacientů v posledních stádiích ledvinného selhání (Chung et al. 2012).

TYK-2 patří do rodiny JAK kináz a hraje důležitou roli ve vztazích mezi metabolismem a imunitou (Vogl et al. 2010). Alterace tohoto proteinu jsou popsány v souvislosti s autoimunitními onemocněními jako SLE nebo revmatoidní artritida (Lee and Bae 2016), také hraje roli ve vývoji DM (Marroqui et al. 2015).

Ve druhé části studie jsme u pacientů se stejným primárním onemocněním, tedy DM, našli méně významných změn. Potvrdili jsme statisticky významné změny v metylaci promotoru genu *IL13* v průběhu HD.

V porovnání se vzorky zdravých dobrovolníků nebyly před HD žádné zásadní rozdíly mezi oběma skupinami, ale po HD jsme pozorovali nižší úroveň metylace u genů *GATA3*, *IL13*, *IL6R*, *IL6ST*, *IL7*, *INHA* a *TYK2* u pacientů. Zdá se pravděpodobné, že úroveň exprese genů spojených s imunitní odpovědí je značně závislá na primárním onemocnění pacienta, zde DM. Opět se tu ukazuje velká provázanost metabolických a imunologických procesů v organismu, protože například role signální dráhy JAK/STAT je v jasné souvislosti s rozvojem imunitních

i metabolických onemocnění (Dodington et al. 2018). Také IL-6 předává svůj signál prostřednictvím receptoru IL-6R v kooperaci s IL-6ST (IL-6 signal transducer, též zvaný glykoprotein 130) dále do signální dráhy JAK kináz (Heinrich et al. 1998).

Vzájemným srovnáním pacientů s nízkou a vysokou potřebou rekombinantního erythropoetinu jsme odhalili rozdíly v metylačním profilu týkající se především genů *IL13RA1*, *IL15*, *EDG3* a *INHA*. Vyšší úroveň metylace promotorů genů *IL13RA1* a *IL15* u pacientů s nízkými terapeutickými dávkami je v souladu s výše zmiňovanou úlohou IL-13 (Cooper et al. 2003) a analogicky i s funkcí IL-15 jako inhibitoru erytropoézy (Mullarky et al. 2007).

Jak bylo výše uvedeno, změny v metylacích byly patrné i u zdravých dobrovolníků, což by mohlo korespondovat se změnami hladin glukokortikoidů v souvislosti s cirkadiánními rytmy (Son et al. 2011).

Tyto naše výsledky byly zatím citovány v pěti člancích, zabývajících se převážně cfDNA u nefrologických pacientů a jejími epigenetickými změnami (Cao et al. 2014, Cichota et al. 2015, Ghigolea et al. 2015, Ammerpohl et al. 2016, Celec et al. 2018).

3.1.6 Závěr

Z výsledků studie vyplývá, že změny metylací promotorů některých genů, hrajících úlohu v imunitních procesech, jsou monitorovatelné i v průběhu relativně krátkého intervalu. Největší změny jsme našli u genů *IL7*, *IL13*, *IL17C* a *TYK2* mezi pacienty před a po HD ve smyslu snížení metylace jejich promotorů po HD. Rozdíly proti zdravým dobrovolníkům byly hlavně po skončení HD procedury, nejvíce v genech *IL13*, *IL17C* a *TYK2*, opět s nižším procentem metylovaných promotorů u pacientů po HD.

Druhá část studie se zaměřila na skupinu pacientů se stejným primárním onemocněním, které vedlo k renálnímu selhání. Zde se jednalo o diabetes mellitus. Byly potvrzeny alterace promotoru genu *IL13* mezi pacienty před a po HD. Rozdíly proti zdravým osobám byly po HD u genů *GATA3*, *IL13*, *IL6R*, *IL6ST*, *IL7*, *INHA* a *TYK2*.

Při srovnání pacientů rozdělených podle potřebné dávky rekombinantního erythropoetinu v terapii anémie byla nalezena vyšší úroveň metylace u genů *IL13RA1*, *IL15*, *EDG3* a *INHA* u pacientů s dobrou odpovídací na léčbu a tedy nižšími dávkami léčiva.

3.1.7 Příloha 1 – články

K této části práce byly publikovány tři články, které jsou přiloženy na následujících stránkách.

3.1.7.1 Alterations in methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA during a hemodialysis procedure

Autoři: Marie Korabečná, Eva Pazourková, Aleš Hořínek, Magdalena Mokrejšová, Vladimír Tesar

Publikováno v Expert Opinion on Biological Therapy v roce 2012

Citace:

Korabecna, M., Pazourkova, E., Horinek, A., Mokrejsova, M., and Tesar, V. (2012). Alterations in methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA during a hemodialysis procedure. Expert opinion on biological therapy 12 Suppl 1, S27-33.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

3.1.7.2 Methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA differs in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy according to the intensity of anemia therapy

Autoři: Marie Korabečná, Eva Pazourková, Aleš Hořínek, Magdalena Mokrejšová, Vladimír Tesař

Publikováno v Blood Purification v roce 2013

Citace:

Korabecna, M., Pazourkova, E., Horinek, A., Mokrejsova, M., and Tesar, V. (2013). Methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA differs in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy according to the intensity of anemia therapy. Blood purification 36, 280-286.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

3.1.7.3 Cell-free nucleic acids as biomarkers in dialyzed patients

Autoři: Marie Korabečná, Eva Pazourková, Aleš Hořínek, Kateřina Ročínová, Vladimír Tesar

Publikováno v Journal of nephrology v roce 2013

Citace:

Korabecna, M., Pazourkova, E., Horinek, A., Rocinova, K., and Tesar, V. (2013). Cell-free nucleic acids as biomarkers in dialyzed patients. Journal of nephrology 26, 1001-1008.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

3.2 Akutní myeloidní leukémie

3.2.1 Předpoklady a cíle studie

Cílem naší studie bylo zmapovat změny v miRNA profilech v plazmě osob s AML před zahájením léčby a v první kompletní remisi a jejich srovnání s profily u zdravých dobrovolníků. Detekce těchto změn by mohla přispět ke zlepšení diagnostiky onemocnění, určení prognózy, volby vhodného terapeutického protokolu a monitorování stavu remise u pacientů.

3.2.2 Teoretický úvod

3.2.2.1 AML

Akutní myeloidní leukémie patří mezi nejčastější hematologické malignity dospělých pacientů s incidencí 6,8 na 100 000 (Visser et al. 2012). Vzniká maligní transformací hematopoetické kmenové buňky myeloidní řady. Diferenciace transformovaných prekurzorových buněk se zastavuje na úrovni nezralých blastů, které se následně kumulují v kostní dřeni, kde tvoří více než 30 % buněk a postupně vytlačují normální hematopoézu. Také v periferní krvi nacházíme větší procento blastů (typicky > 5 %). Charakteristický je tzv. hiatus leucaemicus, kdy jsou v periferní krvi přítomny blasty a zralé granulocyty přežívající z původní krvetvorby, ale chybí všechny mezistupně granulopoézy (Bainton et al. 1977). Z klinických příznaků dominují anémie, trombocytopenie a infekce vyplývající z neutropenie.

Klasifikace FAB (Francouzsko-Americko-Britská) rozlišuje 8 podtypů M0 - M7 (Tefferi et al. 2009), které se liší původem buněk z jednotlivých prekurzorových linií a stupněm diferenciace blastů. Z prognostického hlediska je důležitá přítomnost cytogeneticky detekovatelných abnormalit chromozómů, na jejichž základě lze pacienty rozdělit do tří skupin (Gregory et al. 2009). Pacienti s některými transformacemi, například t(16,16), mají dobrou prognózu s pětiletým přežitím okolo 55 %. Pacienti s normálním karyotypem, trisomií 8 nebo t(9,11) jsou ve střední skupině, kde pětileté přežití kolísá mezi 24 % až 42 %. Nejhorší prognózu mají pacienti s komplexními aberacemi, určitými delecemi nebo t(3,3), t(6,9) a t(9,22), u nichž pětileté přežití nepřesahuje 11 % (Slovak et al. 2000).

Léčba pacientů s AML zahrnuje chemoterapii podle specifických léčebných protokolů s eventuální možností transplantace kostní dřeně.

3.2.2.2 miRNA u AML

V době provádění této studie byly publikovány pouze 3 práce zabývající se obsahem miRNA v plasmě pacientů s AML (Tanaka et al. 2009, Fayyad-Kazan et al. 2013, El-Halawani et al. 2014). Fayyad-Kazan et al. (Fayyad-Kazan et al. 2013) popisují 4 miRNA (let-7d, miR-150, miR-339 a miR-342) snížené u pacientů v době diagnózy a 2 miRNA (let-7b a miR-523) zvýšené. Zároveň byl analyzován soubor jiných pacientů po léčbě, u kterých byly hladiny uvedených miRNA shodné jako u zdravých kontrol. Další dvě práce referují o snížených hladinách miR-92 v plazmě AML pacientů (Tanaka et al. 2009, El-Halawani et al. 2014).

3.2.3 Metodika

Ve studii byly analyzovány vzorky plazmy malého, ale unikátního souboru 8 pacientů, se stejným terapeutickým protokolem, u kterých byly k dispozici odběry před léčbou i po dosažení remise před transplantací. Jednalo se o 4 muže a 4 ženy ve věkovém rozpětí 31 až 62 let. U těchto pacientů bylo 5x dosaženo kompletní remise, 2x parciální remise a jeden pacient byl rezistentní na léčbu. Všichni pacienti byli dále sledováni ještě další 3 roky, 4 z nich v průběhu této doby zemřeli.

V kontrolním souboru bylo 10 zdravých dobrovolníků. U každého z nich byly k dispozici 2 vzorky plazmy ze dvou různých odběrů. Jednalo se o ranní a odpolední odběr ve stejný den, aby bylo sníženo riziko chyby založené na eventuelních změnách profilu v důsledku cirkadiánní rytmicity.

MikroRNA byly izolovány z 200 µl plazmy pomocí miRNeasy Serum/Plasma Kitu (Qiagen), přepsány reverzní transkripcí do cDNA (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit a Megaplex RT primer Human Pool A a Pool B, Life Technologies), preamplifikovány (TaqMan MicroRNA Preamplification a Megaplex PreAmp primer Human Pool A a Pool B, Life Technologies) a analyzovány pomocí TaqMan Human miRNA Array Card A v.2.1. a B v.3.0 (Life Technologies) metodou real-time PCR na stroji 7900HT Fast Real Time PCR (Life

Technologies). Pro výslednou interpretaci bylo použito dvou normalizačních metod, při jedné bylo využito miR-16 jako referenčního genu, u druhé jsme použili místo referenčního genu normalizaci ke „global mean“ (Expression Suite software v1.0.3., Life Technologies).

Ve druhé fázi studie byla provedena validace dosavadních výsledků. Analyzovány byly pouze miRNA vyhodnocené jako statisticky nejvýznamnější. K izolaci miRNA byla použita jiná izolační technika – NucleoSpin miRNA Plasma Kit (MACHEREY-NAGEL). Po reverzní transkripci (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit a specifické TaqMan miRNA primery pro vybrané miRNA, Life Technologies) byla cDNA analyzována s využitím primerů specifických pro jednotlivé vybrané miRNA a TaqMan Universal PCR Master Mixu II (Life Technologies) metodou real-time PCR na přístroji QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Life Technologies). Normalizace byla provedena na miR-16. Ke statistickému zpracování byly použity softwary STATISTICA verze 10 (StatSoft) a qbase+ (Biogazelle), pro shlukovou analýzu program GENE-E (Broad Institute) a k validaci cílů databáze miR-Walk (Dweep et al. 2014).

3.2.4 Výsledky

Nejprve bylo srovnáním výsledků obou normalizačních metod (global mean, miR-16) vyhodnoceno 6 kandidátních miRNA (miR-199b-5p, miR-301b, miR-326, miR-361-5p, miR-625 a miR-655) se statisticky významně zvýšenými hodnotami v plazmě pacientů před zahájením léčby proti hladinám u zdravých osob nezávisle na denní době odběru. P - hodnoty zjištěné Mann-Whitneyovým testem jsou uvedeny v tabulce 1. Exprese těchto 6 miRNA byla po léčbě nižší. I když nedosáhla hodnot, které jsme pozorovali u zdravých dobrovolníků, statisticky významně už se od nich nelišila. Výsledky byly nezávislé na použité metodě normalizace a použitém souboru plazem zdravých osob (ranní nebo odpolední). Pro další fázi byla tedy vybrána normalizace pomocí miR-16 a ranní soubor plazem od dobrovolníků.

Výsledky následující validační fáze potvrdily závěry předchozí části studie. U všech 6 miRNA se jejich exprese u pacientů před léčbou statisticky významně lišila od zdravých osob. Hodnoty po léčbě byly nižší. Při porovnání Mann-Whitneyovým testem se stále od zdravých lišily, při použití Wicxonova testu pro párové vzorky ke srovnání expresí před a po léčbě se p - hodnoty pohybovaly na hranici statistické významnosti (tabulka 1). Pro ilustraci jsou přiloženy grafy výsledků u dvou z těchto miRNA (graf 7 a 8).

MiRNA profil pacienta rezistentního na léčbu vykazoval odlišnosti od ostatních vzorků ve skupině pacientů po léčbě. U dvou z 6 před léčbou signifikantně zvýšených miRNA, konkrétně miR-361-5p a miR-655, u něj nedošlo k očekávanému poklesu exprese a jejich hladiny zůstaly i po léčbě zvýšené.

V databázi miRWalk bylo nalezeno větší množství potenciálních cílů zvláště pro miRNA miR-199b-5p a miR-326. Dvě z uvedených miRNA (miR-625, miR-655) by se měly podílet na regulaci genu *DICER1*, jehož produkt je stěžejní pro samotnou produkci miRNA. Další dvě (miR-199b-5p, miR-301b) potom hrají roli v regulaci genu *DNMT1*, který kóduje enzym DNA-metyltransferázu 1, jež má rovněž klíčovou roli v regulačních procesech.

Tabulka 1

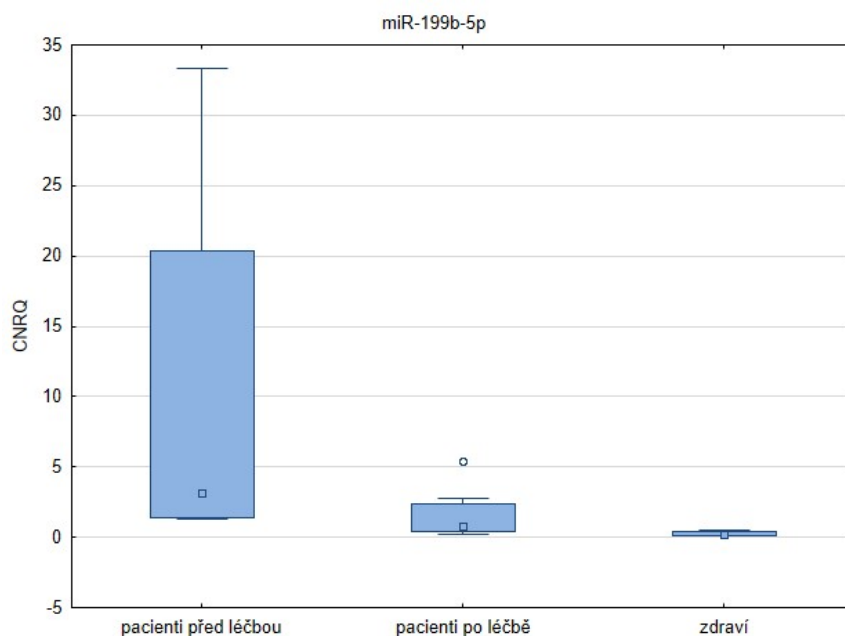
Výsledky porovnání hodnot u pacientů před léčbou a zdravých osob v pilotní i validační fázi (Mann-Whitneyův test, Benjamini-Hochbergova korekce, p - hodnoty) a hodnot u pacientů před a po léčbě (Wilcoxonův test, Benjamini-Hochbergova korekce, p - hodnoty). Použitá normalizace miR-16. U souboru zdravých osob jsou použity hodnoty z ranního odběru.

miRNA	pilotní fáze	validační fáze	
	pacienti před léčbou a zdravé osoby	pacienti před léčbou a zdravé osoby	pacienti před léčbou a po léčbě
miR-199b-5p	0,0174	0,00005	0,035
miR-301b	0,0116	0,00005	0,046
miR-326	0,0116	0,00005	0,035
miR-361-5p	0,0122	0,00005	0,054
miR-625	0,0087	0,00005	0,035
miR-655	0,0087	0,00018	0,035

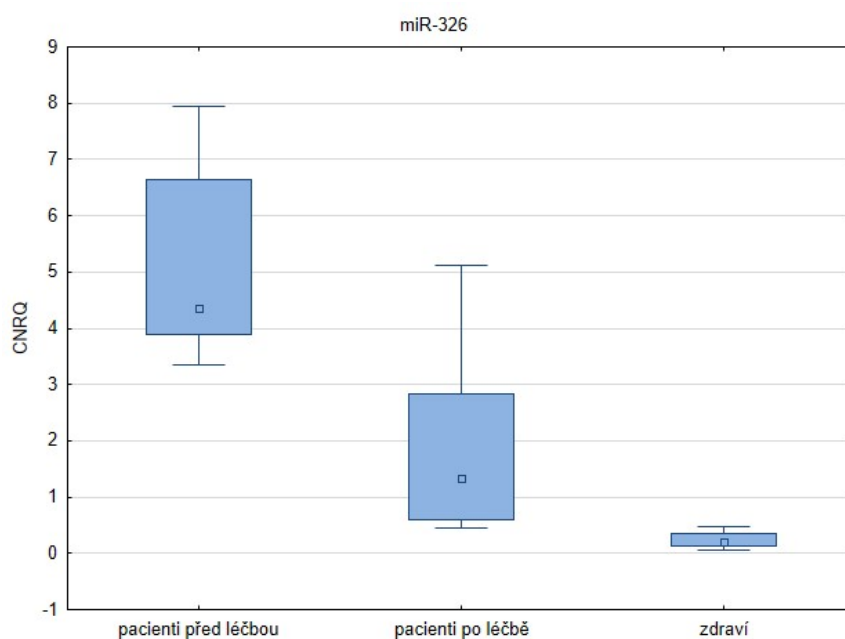
Graf 7 - 8

Krabicové grafy ukazují výsledky kvantifikace miR-199b-5p (graf 7) a miR-326 (graf 8) u pacientů před léčbou, pacientů po léčbě a zdravých osob ve validační fázi. Osa Y - relativní množství (CNRQ – calibrated normalized relative quantities) při normalizaci pomocí miR-16. Čtvereček označuje medián, box horní a dolní kvartil (25 % - 75 %), svorky rozsah neodlehých hodnot, kroužek odlehlá hodnota.

Graf 7



Graf 8



3.2.5 Diskuse

V pilotní části naší studie jsme vyhodnotili 6 miRNA (miR-199b-5p, miR-301b, miR-326, miR-361-5p, miR-625 a miR-655), jejichž exprese je významně zvýšená u pacientů s AML v době před zahájením léčby, po léčbě dochází k jejímu snížení a u zdravých osob jsou tyto miRNA detekovány v mizivých množstvích. Validační fázi, která byla zacílená na tyto miRNA, jsme předchozí závěry potvrdili. Z publikací je zřejmé, že uvedené miRNA jsou spojovány i s jinými typy nádorů. Například miR-199b-5p s karcinomem endometria (Torres et al. 2012), miR-326 s kolorektálním karcinomem (Kjersem et al. 2014), miR-625 s mnohočetným myelomem (Huang et al. 2012). Souvislost se jeví i s neonkologickými onemocněními – hladiny miR-326 jsou zvýšené u DM, kde je jejich potenciálním cílem adiponektin (Santovito et al. 2014), miR-361-5p je zvýšeně exprimována u pacientů s onemocněním koronárních arterií, kde zřejmě snižuje expresi VEGF (Wang et al. 2014). Široké spektrum diagnóz spojovaných s těmito miRNA odpovídá dle našeho mínění zjištění v databázi miRWalk, že cíli daných miRNA jsou geny, které mají zásadní úlohu v regulačních dráhách.

Článek byl zatím 5x citován (Fu et al. 2016, Hocking et al. 2016, Izzotti et al. 2016, Setijono et al. 2017, Wallace and O'Connell 2017). V review Hocking et al. (Hocking et al. 2016) je srovnáván se studií Fayyad-Kazan et al. (Fayyad-Kazan et al. 2013) Obě popisují set miRNA, které jsou alterované v době diagnózy, ale po léčbě jsou jejich hladiny srovnatelné se zdravými kontrolami. V review Izzotti et al. (Izzotti et al. 2016) je uveden tabulkový přehled dosud citovaných miRNA, ze kterého vyplývá, že 6 miRNA, u nichž jsme popsali změny, nebylo v době sepsání review v jiné práci sledováno. Fu et al. (Fu et al. 2016) analyzují plazmy cytogeneticky normálních AML pacientů a udávají zhoršenou prognózu u pacientů s vyšší expresí MAP7. V této souvislosti citují i náš nález zvýšené exprese miR-361, která je s dráhou MAP7 spojena a s expresí MAP7 je pozitivně korelována. Jedna citace je také v souhrnném review Wallace et al. z roku 2017 (Wallace and O'Connell 2017). Zatím poslední zmínka o této práci je v publikaci skupiny Setijono et al. (Setijono et al. 2017) z roku 2017 o myeloidních malignitách, kde je naše práce zmiňována jako příklad alterace miRNA profilu u AML pacientů před i po chemoterapii.

3.2.6 Závěr

Ve studii byly porovnávány vzorky unikátního souboru pacientů s AML odebrané v době diagnózy onemocnění a v první remisi. Zjistili jsme statisticky významné změny v profilu miRNA v plazmě u těchto miRNA - miR-199b-5p, miR-301b, miR-326, miR-361-5p, miR-625 a miR-655. Hladiny těchto 6 miRNA byly významně zvýšené u pacientů na začátku onemocnění, po léčbě se jejich hladiny u většiny pacientů snížily, čímž se přiblížily k profilu zdravých osob, u kterých jsou obsahy daných miRNA na velmi nízkých úrovních. U jednoho pacienta ze souboru, který byl rezistentní na léčbu, nebyl u dvou miRNA (miR-361-5p a miR-655) zaznamenán po léčbě pokles jejich relativních koncentrací v plazmě. Získané výsledky byly ověřeny validací jinou detekční metodou.

3.2.7 Příloha 2 – článek

K této části práce byl publikován článek přiložený na následujících stránkách.

3.2.7.1 The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients

Autoři: Linda Koutová, Monika Štěřbová, Eva Pazourková, Šárka Pospíšilová, Iveta Svobodová, Aleš Hořínek, Daniel Lysák, Marie Korabečná

Publikováno v Leukemia Research v roce 2015

Citace:

Koutova, L., Sterbova, M., Pazourkova, E., Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Lysak, D. and Korabecna, M. (2015). The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients. Leukemia research 39, 1389-1395.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

4 Volné nukleové kyseliny v moči

4.1 Karcinom močového měchýře

4.1.1 Předpoklady a cíle studie

Studie zabývající se analýzou volných nukleových kyselin v moči pacientů s karcinomem močového měchýře si kladla za cíl pokusit se najít vhodný neinvazivní marker, který by umožňoval diagnostiku karcinomu močového měchýře bez nutnosti použití cystoskopie, nebo alespoň zpřesňoval a rozšiřoval možnosti diagnostiky cytologického vyšetření moči.

V první části tohoto projektu byl analyzován obsah volné DNA v moči (ucfDNA, urinary cell free DNA) s cílem najít odpověď na 3 základní otázky. První dvě byly metodického charakteru. Za prvé, jestli jsou rozdíly v obsahu ucfDNA v první a druhé ranní moči a který z těchto vzorků je vhodnější používat? Druhá otázka byla, jak správně kvantifikovat ucfDNA, protože v dosud publikovaných studiích (Zancan et al. 2005, Chang et al. 2007, Zancan et al. 2009) nebyla tato problematika uspokojivě a jednotně vyřešena. Třetí otázkou je pak hlavní důvod této studie, tedy zda lze množství ucfDNA použít jako marker pro diagnostiku karcinomu močového měchýře.

Ve druhé části byly zkoumány hladiny volných miRNA, které by, vzhledem ke svým regulačním funkcím, mohly být u pacientů s karcinomem výrazně alterovány, jako to vidíme i u jiných onkologických onemocnění. Zde bylo nutné nejprve analyzovat skupinu miRNA, které se vyskytují v moči každého jedince bez ohledu na zdravotní stav, pohlaví a věk. V rámci různých studií (Hanson et al. 2009, Silva et al. 2015), které byly prováděny hlavně z forenzních důvodů, byly totiž publikovány miRNA profily v různých tělních tekutinách, ale moč z tohoto hlediska analyzována nebyla.

4.1.2 Teoretický úvod

4.1.2.1 Karcinom močového měchýře

Karcinom močového měchýře je celosvětově jednou z nejčastějších malignit mužské populace. U žen se vykytuje 3x méně, přesto také patří k velmi častým malignitám. Jeho incidence po dlouhodobém trendu neustálého růstu zůstává v posledních letech na zhruba stejné úrovni, mortalita se díky zlepšující se diagnostice a léčebným metodám spíše snižuje (Dušek et al. 2005).

Příznaky tohoto onemocnění jsou nespecifické a překrývají se s širokým spektrem dalších onemocnění močového traktu. Jedná se hlavně o makroskopickou, někdy pouze o mikroskopickou, hematurii. Část pacientů přichází s iritačními příznaky, jako jsou dysurie, polakisurie a urgence. Při obstrukci močovodů potom může dojít i k poškození ledvin (pyelonefritida, hydronefróza) a urémii. V počátečních stádiích může být průběh onemocnění zcela asymptomatický.

Nádory močového měchýře lze klasifikovat podle TNM klasifikace (Rouprêt et al. 2018). Stadium pTa je papilární neinvazivní nádor, který neprorůstá do hlubších vrstev, stadium pT1 infiltruje subepiteliální pojivovou tkáň. Tyto dva typy se někdy souhrnně nazývají jako povrchové nádory, neinfiltrující svalovinu. K nim je řazen ještě *carcinoma in situ* (CIS), špatně diferencovaný nádor rostoucí ve sliznici. Přestože pT1 a CIS jsou agresivnější tumory, je celá skupina považována spíše za prognosticky příznivější. Pacienti jsou ohroženi hlavně vysokým počtem recidiv, při kterých může dojít i k progresi do vyšších stadií (Saad et al. 2002). Nádorovou tkáň lze beze zbytku odstranit pomocí transuretrální resekce (TURB), ovšem je nutné další pravidelné sledování vzhledem k časté rekurenci nádoru (Brausi et al. 2002).

Prognosticky horší jsou nádory více invazivní, prorůstající do svaloviny a hlubších struktur močového měchýře. Stadium pT2 infiltruje svalovinu, pT3 perivezikulární tkáň a při pT4 už se nádor šíří i do okolních orgánů. Zde je léčbou volby radikální operace, případně doplněná o chemoterapii nebo aktinoterapii (Witjes et al. 2014).

Podle histopatologického nálezu stupně diferenciace tumoru dělíme nádory na LG (low grade) s vyšším stupněm diferenciace a lepší prognózou a HG (high grade), málo diferencované nebo nediferencované nádory s horší prognózou (Rouprêt et al. 2018).

Na molekulární úrovni byly nalezeny rozdíly mezi neinvazivními tumory (pTa) a invazivními (pT1 – pT4), včetně rozdílných expresí miRNA (Knowles 2006, Catto et al. 2009).

Základním screeningovým vyšetřením je cytologické vyšetření moči s barvením buněk podle Papanicolaua. Jeho výsledky jsou pouze orientační. Udávaná specifita je až 99 %, ale senzitivita je poměrně nízká (20 – 53 %), odlišná u dobře a špatně diferencovaných nádorů (Lotan and Roehrborn 2003). PAP 1-2 sice znamená negativní nález, ale nevylučuje zcela přítomnost dobře diferencovaného karcinomu nízkého stupně malignity. PAP 4-5 je pozitivní nález. Nálezy PAP 3 spadají do tzv. šedé zóny, tedy nálezy suspektní, jejichž skutečná vypovídající hodnota je nulová (Owens et al. 2013).

Zpřesňující neinvazivní vyšetřovací metodou je sonografie, která je, i přes stále se zdokonalující technické možnosti, limitována velikostí nádoru, jíž je schopna zachytit (Stamatiou et al. 2011). Jedinou zcela spolehlivou diagnostickou metodou je cystoskopie (Evelyne et al. 2011). Umožňuje i odběr tkáně pro přesné histologické vyšetření, ale jedná se o metodu invazivní.

Z hlediska prognózy je samozřejmě jedním z hlavních faktorů včasný záchyt, který je komplikován nepřítomností specifických příznaků a absencí vhodné neinvazivní vyšetřovací metody. Navíc je u pacientů po léčbě nutná jejich následná dispenzarizace vzhledem k vysokému riziku rekurence tohoto typu nádoru. Z uvedených důvodů je snaha najít vhodný neinvazivní způsob zpřesňující nebo zcela nahrazující dosavadní vyšetřovací postupy (Schmitz-Drager et al. 2015, Soukup et al. 2015).

4.1.2.2 cfDNA v moči

Zatím není zcela jasné, jak velká frakce cfDNA, která je přítomna v moči, pochází přímo z tkání ureterů a močového měchýře a jaký podíl na obsahu cfDNA má přímý transrenální transfer z cirkulace. Hypotézu transferu DNA z cirkulace do moči uvedla ve své práci Botezatu (Botezatu et al. 2000) v roce 2000. Referuje v ní o detekci lidské DNA v moči myší, kterým byla tato DNA injekčně aplikována. Dále svoji teorii podporuje nálezy mužských specifických sekvencí v moči žen po transfuzích krve od mužského dárce a těhotných s plodem mužského pohlaví. Rovněž uvádí detekci K-ras mutace v močích pacientů s adenokarcinomem tlustého střeva a karcinomem pankreatu. Od té doby je v různých publikacích tato teorie střídavě potvrzována a negována. Bryzgunova et al. (Bryzgunova et al. 2006) potvrdila detekci stejných metylovaných promotorů RASSF1A a RARB2 jak v plazmě, tak v moči pacientek s karcinomem prsu. Některé studie potvrzují možnost detekce

mužských sekvencí DNA v moči těhotných žen nesoucích plod mužského pohlaví (Al-Yatama et al. 2001, Majer et al. 2007), jiné hovoří o opaku (Zhong et al. 2001, Li et al. 2003, Illanes et al. 2006).

Velmi zajímavá je studie Hung et al. z roku 2009 (Hung et al. 2009). Jsou v ní analyzovány vzorky plazmy a moči 22 pacientů po úspěšné transplantaci kostní dřeně. 10 z těchto pacientů dostalo dřeň od dárce stejného pohlaví, 12 bylo transplantováno dření od dárce opačného pohlaví. U nich byly detekovány vysoké koncentrace DNA dárce v plazmě - u žen s dření mužského dárce bylo 79,3 % DNA v plazmě mužské, u pacientů mužů s dření od dárců ženského pohlaví pak bylo mužské DNA v plazmě 27,2 %, tj. zbývajících 72,8 % bylo opět DNA derivované z dárcovských buněk. Také v moči všech 5 pacientek transplantovaných dření mužského dárce byly nalezeny specifické mužské sekvence (průměrná frakce této dárcovské DNA byla 38,3 %). Ovšem mezi množstvím mužské DNA v plazmě a v moči nebyly nalezeny žádné korelace. Navíc byly v moči detekovány i fragmenty o velikosti více než 350 bp, které v plazmě nebyly přítomny. Na základě tohoto zjištění následovaly analýzy buněk v peletu po centrifugaci moči, které nastínily původ těchto delších fragmentů DNA. V peletu byly totiž identifikovány epiteliální buňky pacienta, ale také malá frakce buněk dárcovského původu, které morfologicky vypadaly jako buňky epiteliální. V další fázi byla potom barvením na cytokeratin epiteliální příslušnost těchto buněk potvrzena. Byly nalezeny u tří z deseti pacientů, u nichž tvořily 0,4 – 1,3 % epiteliálních buněk přítomných v moči. Tito pacienti byli v době odběru vzorků 2-14 let po proběhlé transplantaci.

Bez ohledu na výše zmíněné výsledky je ale jisté, že obsah ucfDNA je velmi zřetelně ovlivněn fyziologií dolních částí uropoetického traktu. V době našeho výzkumu se většina analýz ucfDNA u onkologických pacientů zabývala karcinomem prostaty (Muller and Brenner 2006, Casadio et al. 2013, Truong et al. 2013). Práce sledující ucfDNA v supernatantu u pacientů s karcinomem močového měchýře byly de facto pouze čtyři:

Casadio et al. (Casadio et al. 2013) pracují s hypotézou, že pokud cfDNA pocházející z apoptotických buněk má fragmenty kratší než cfDNA uvolněná z nádorových buněk, mělo by být možné na základě analýzy délky fragmentů DNA odlišit pacienty s karcinomem. Jejich pilotní studie tuto hypotézu potvrzuje, ale závěry nebyly nikde dále verifikovány. Tataž skupina se ovšem zabývala i metodicky stejnou analýzou u pacientů s karcinomem prostaty. Tady byly výsledky jejich pilotní práce (Casadio et al. 2013) potvrzeny i následnou studií (Salvi et al. 2015). Přestože prediktivní hodnoty jejich analýz byly velmi dobré, nedosahovaly

výpovědních hodnot běžně používaného vyšetření PSA, takže pro diagnostiku karcinomu prostaty neznamenaají zatím žádný přínos.

V pilotní studii Zancan et al. (Zancan et al. 2005) byly analyzovány vzorky 35 pacientů se suspektním karcinomem močového měchýře. Studie měla slibné výsledky. Na základě vysokých koncentrací ucfDNA byli diagnostikováni všichni pacienti s pozitivní cystoskopií. Bylo ale určeno i 36,8 % falešně pozitivních výsledků. Následná studie stejné skupiny (Zancan et al. 2009) vycházela opět z koncentrací ucfDNA, které byly měřeny různými metodami - spektrofotometricky (GeneQuant Pro, Nano Drop 1000), fluorometricky (Quant-iT DNA high-sensitivity assay kit) a pomocí real-time PCR (gen *APP* pro amyloidový prekurzorový protein). Ovšem závěry pilotního projektu potvrzeny nebyly, tudíž bylo uzavřeno, že koncentrace ucfDNA nejsou jako marker onkologického onemocnění močového měchýře použitelné.

V publikaci Chang et al. (Chang et al. 2007) nejsou hodnoceny samotné koncentrace ucfDNA, ale jejich hodnoty jsou adjustovány na koncentraci močového kreatininu. Dle vyjádření autorů je tímto způsobem odlišení pacientů s nádorem od zdravých osob možné.

4.1.2.3 miRNA v moči u karcinomu močového měchýře

V době přípravy této studie bylo publikováno několik prací zabývajících se alteracemi miRNA u pacientů s karcinomem močového měchýře. Část z nich analyzovalo přímo vzorky nádorové tkáně (Lin et al. 2009, Wszolek et al. 2011, Yoshino et al. 2011, Pignot et al. 2013, Feng et al. 2014, Zhang et al. 2014, Mahdavinezhad et al. 2015, Mahdavinezhad et al. 2015, Zhou et al. 2015). V nich se nejčastěji objevují snížené koncentrace miR-99a (Feng et al. 2014, Zhang et al. 2014, Zhou et al. 2015), miR-143 (Lin et al. 2009, Pignot et al. 2013, Zhang et al. 2014), miR-145 (Lin et al. 2009, Pignot et al. 2013, Zhou et al. 2015), miR-125b (11)(Lin et al. 2009, Zhang et al. 2014, Zhou et al. 2015), miR-133a/b (Yoshino et al. 2011, Pignot et al. 2013, Zhang et al. 2014) a miR-1 (Yoshino et al. 2011, Pignot et al. 2013, Zhang et al. 2014).

Zajímavé může být například zjištění skupiny Wszolek et al. (Wszolek et al. 2011), kteří ve své práci porovnávají vzorky tkání invazivních a neinvazivních tumorů. Udávají hladiny miR-99a jako zvýšené v neinvazivních tumorech proti invazivním. Dále referují o snížených hladinách miRNA, které jsou v jiných publikacích naopak citovány jako zvýšené oproti

zdravé tkáni. Jsou to miRNA miR-30b (Mahdavinezhad et al. 2015, Mahdavinezhad et al. 2015), miR-141 (Mahdavinezhad et al. 2015, Mahdavinezhad et al. 2015, Zhou et al. 2015), miR-200b/c (Pignot et al. 2013, Mahdavinezhad et al. 2015, Mahdavinezhad et al. 2015, Zhou et al. 2015) a miR-21 (Zhou et al. 2015). Zatím nevíme, jestli tyto nálezy odráží spíše špatnou vzájemnou porovnatelnost výsledků miRNA studií (Jarry et al. 2014), nebo skutečně poukazují na možnou roli miRNA ve vývoji nádoru od neinvazivního k invazivnímu, jak to naznačuje i další studie Lin et al. (Lin et al. 2009). Ta hovoří o snížených hladinách miR-143 v nádorové tkáni a zároveň ukazuje, že růst buněk v kultuře byl inhibován v liniích transfekovaných miR-143, z čehož lze vyvozovat tumorsupresorovou roli této miRNA.

Pouze jedna studie analyzovala miRNA profil v plazmě pacientů a udává zvýšené hladiny miR-99a (Feng et al. 2014). Další studie zkoumaly plnou moč (Hanke et al. 2010, Yamada et al. 2011, Wei et al. 2015). Referují o up-regulaci miR-96 a miR-183 (Yamada et al. 2011), miR-126 a miR-182 (Hanke et al. 2010, Wei et al. 2015).

Pro nás nejzajímavější byla skupina studií, které se zabývaly analýzou močového supernatantu (Yun et al. 2012, Kim et al. 2013, Snowdon et al. 2013, Zhang et al. 2014, Zhou et al. 2014). Zhang et al. (Zhang et al. 2014) ve své publikaci popisuje snížené hladiny miR-99a, miR-125b, miR-133b a miR-143 v supernatantu, tedy stejně jako přímo ve tkáni nádoru, navíc hladiny korelují s velikostí nádoru. Doporučuje miR-99a a miR-125b jako marker onemocnění. U těchto dvou miRNA je také popsán návrat jejich hodnot k normálu do čtyř týdnů po operaci. Down-regulaci miR-125b udává také Snowdon et al. (Snowdon et al. 2013) a miR-145 Yun et al. (Yun et al. 2012).

Naopak zvýšené hladiny byly detekovány u miR-214 (Kim et al. 2013) a miR-106b (Zhou et al. 2014), která patří mezi miRNA často citované v souvislosti s kancerogenezí (Kan et al. 2009, Hudson et al. 2013). I její hladiny klesají v průběhu několika týdnů po chirurgickém odstranění nádoru.

4.1.3 První část studie – výzkum cfDNA

4.1.3.1 Metodika

V naší studii bylo zahrnuto 66 pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře a 34 kontrolních vzorků, z toho 23 zdravých dobrovolníků a 11 pacientů s benigním urologickým onemocněním. Z tohoto celkového počtu byly u 27 osob (10 pacientů s maligním onemocněním, 6 s benigním, 11 zdravých osob) odebrány 2 vzorky moči, první ranní a druhá, zhruba 2 hodiny po prvním odběru. U ostatních osob byla odebrána pouze druhá ranní moč. Ze studie byly vyloučeny osoby s pozitivní bakteriurií a leukocyturií. Cytologie moči byla hodnocena jako negativní nález u PAP I + II a pozitivní u PAP III až V.

Pacienti s karcinomem podstoupili buď TURB (45 osob) nebo radikální cystektomii (21 osob). Patologem bylo definováno 25 nádorů jako stadium pTa, 20 jako pT1, jeden jako CIS (carcinoma *in situ*) a zbývajících 20 jako vyšší stadia pT2 – pT4.

Moč byla po odběru stabilizována (0,5M EDTA), ihned stočena a uchovávána v -20 °C. Volná DNA byla izolována z 2 ml supernatantu pomocí QiaAMP Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). Vlastní měření koncentrace bylo provedeno metodou real-time PCR na přístroji 7900HT Fast Real Time PCR (Life Technologies) absolutní kvantifikací housekeeping genu *GAPDH* pomocí standardní křivky.

Statistické zpracování bylo provedeno programem STATISTICA verze 10 (StatSoft) a MedCalc (MedCalc Software).

4.1.3.2 Výsledky

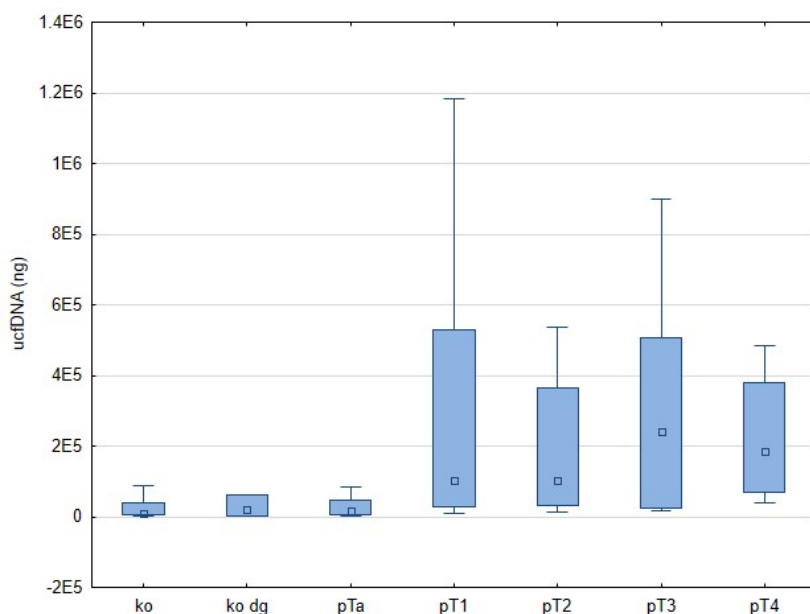
V prvotní fázi bylo z metodologického hlediska zkoumáno 27 vzorků. U nich byly analyzovány vždy dva odběry moči ve stejný den – první a druhá ranní moč. Koncentrace ucfDNA ve druhé ranní moči byly vyšší (Wilcoxonův test, $p = 0,044$), vymočené objemy byly naopak signifikantně nižší (Wilcoxonův test, $p = 0,002$). Pokud jsme použili celkové množství ucfDNA, vypočítané vynásobením koncentrace ucfDNA a příslušného vymočeného objemu, hodnoty u první a druhé ranní moči se nelišily (Wilcoxonův test, $p = 1,0$). Rovněž regresní analýza potvrdila závislost mezi objemem moči a koncentrací ucfDNA ($p = 0,0001$). V následujících analýzách jsme tedy pracovali s hodnotami celkového množství ucfDNA. Protože při použití těchto hodnot není rozdílu mezi první a druhou ranní močí, bylo z praktického hlediska rozhodnuto používat druhý ranní odběr.

Následně byly porovnávány hladiny ucfDNA u pacientů a zdravých osob (graf 9). Celkové množství ucfDNA bylo ve skupině pacientů statisticky signifikantně vyšší (Mann-Whitneyův test, $p = 0,0002$). Za použití Kruskal-Wallisovy ANOVY byla porovnána množství ucfDNA navzájem ve všech třech skupinách. Významné rozdíly byly nalezeny mezi skupinou zdravých a onkologických pacientů ($p = 0,0009$), ale hodnoty těchto pacientů se nelišily od pacientů s benigními urologickými diagnózami ($p = 0,3$). Zároveň byly takto porovnány i hodnoty mezi skupinami pacientů s různými stadii onemocnění. Zatímco zdravé osoby se lišily od všech podskupin od stadia pT1 výše ($p < 0,0001$), od podskupiny pTa se nelišily. Navíc se podskupina pTa odlišovala od podskupiny s vyššími stadii onemocnění ($p < 0,0001$).

Konstrukcí ROC křivky jsme získali hodnotu AUC 0,725. AUC (area under the curve) znázorňuje obsah plochy pod křivkou a demonstruje tím výpovědní hodnotu dané metody. Hodnota 0,725 vykazuje jistý potenciál k odlišení pacientů s karcinomem, ale pro diagnostické použití je příliš nízká (graf 10). Při prahové hodnotě 65,055 ng (cut-off) byly stanoveny hodnoty nejlepší senzitivity a specifity testu – senzitivita 42,4 % a specifita 91,2 %. Prediktivní hodnota pozitivního testu je 90 % a negativního testu je 45 %. Pokud tuto metodu srovnáme s dosud běžně používanou cytologií, získáme zhruba stejné výpovědní hodnoty. V našem souboru pacientů byl u LG nádorů diagnostikován oproti cytologickému vyšetření jeden případ navíc, ale na druhou stranu přibyly také 3 falešně pozitivní vzorky. U HG nádorů pak bylo diagnostikováno o 2 pacienty více než dle výsledků cytologie.

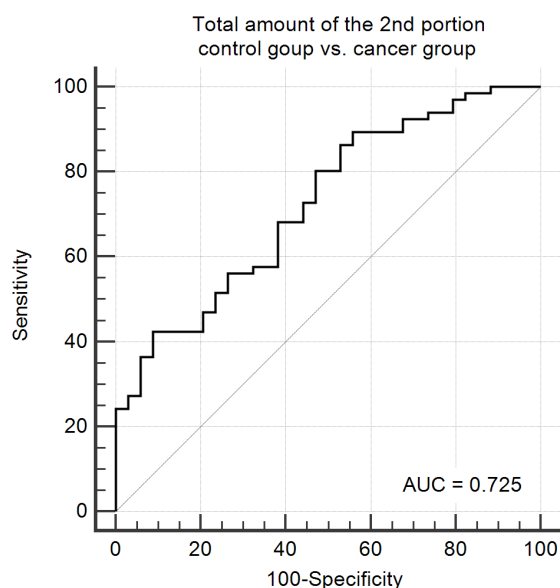
Graf 9

Krabicový graf celkového obsahu ucfDNA ve druhé ranní moči (ng) u zdravých osob (ko), pacientů s benigní urologickou diagnózou (ko dg) a pacientů s jednotlivými stadii pT uroteliálního karcinomu. Čtvereček označuje medián, box horní a dolní kvartil (25 % - 75 %), svorky rozsah neodlehých hodnot.



Graf 10

ROC křivka. Diagnostická účinnost celkového obsahu ucfDNA ve druhé ranní moči (skupina pacientů s karcinomem močového měchýře proti skupině zdravých osob). Obsah plochy pod křivkou (AUC) je 0,725. Při prahové hodnotě 65,055 ng (cut-off) je senzitivita testu 42,4 % a specifita 91,2 %. Graf převzat z publikovaného článku (Brisuda et al. 2016).



4.1.3.3 Diskuse

Cílem studie bylo odpovědět na tři otázky. O obsahu ucfDNA v první a druhé ranní porci moči jsme zjistili, že pokud bychom porovnávali koncentrace, bude jejich průměrná hodnota

vyšší v druhé ranní moči. Jestliže ale porovnáváme celkové množství ucfDNA v konkrétních porcích moči (tedy koncentrace vynásobené vymočeným objemem) budou tato množství u jednotlivých pacientů konstantní. Nezáleží tedy na tom, který z odběrů použijeme. My jsme se rozhodli pro druhou ranní moč z důvodu lepší spolupráce odebíraných osob a konstantní době (2 hodiny) setrvání moči v močovém měchýři na rozdíl od proměnlivého nočního intervalu u jednotlivých osob. Zároveň je tato doba relativně krátká, což znamená menší úroveň cytolyzy než u delších nočních intervalů.

Rovněž jsme zodpověděli i otázku kvantifikace. Z předchozích studií vyplývalo, že vhodnější než samotná koncentrace ucfDNA bude přepočet zohledňující celkovou koncentraci moči, například adjustace na kreatinin (Chang et al. 2007). Naše metoda výpočtu celkového množství ucfDNA se zdá být pro tento účel vyhovující, i když měření celkového vymočeného objemu není vždy pohodlné. Ovšem i metoda s přepočtem na kreatinin má svá úskalí. Hladiny kreatininu v moči jsou závislé na úrovni glomerulární filtrace, příjmu tekutin a individuálním metabolismu. Jsou vyšší u mužů než u žen, kolísají s věkem a jsou zde pozorovány i etnické rozdíly (Dyer et al. 2004).

Co se týká hlavního cíle studie, nalézt vhodný marker pro neinvazivní diagnostiku karcinomu močového měchýře, dospěly naše analýzy k velmi podobné senzitivitě a specifitě jako má běžně užívaná metoda cytologická (Lotan and Roehrborn 2003). Možnost odlišení pacientů od zdravých kontrol je v souladu s předchozí studií Chang et al. (Chang et al. 2007). Na rozdíl od této studie jsme ovšem zaznamenali i odlišnosti mezi pacienty s pTa stadiem a vyššími stadii nádoru. Naše závěry jsou zdánlivě v rozporu se závěry studie Zancan et al. z roku 2009 (Zancan et al. 2009). Ovšem soubor pacientů v této studii zahrnoval převážně pacienty se stadiem pTa, kteří se, pokud jsou vyčleněni jako samostatná skupina, od zdravých kontrol ani podle našich závěrů neliší. Ani jedna ze studií neuvádí, jestli jako kontrolní skupinu používali zdravé osoby nebo pacienty s jiným urologickým onemocněním. Zde je ovšem nutno si uvědomit, že karcinom močového měchýře je především nádorem mužů vyššího věku, u kterých se již velmi těžko hledají do kontrolní skupiny osoby zcela zdravé, protože většina z nich už má nějaký interní, často i urologický nález přiměřený věku.

Publikace byla dosud pětkrát citována. V souhrnném review Peng et al. Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer v časopisu Oncotarget (Peng et al. 2017), v review Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer skupiny Lu et al. (Lu and Li 2017), v review Di Meo et al. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies (Di Meo et al. 2017), kde je jedinou prací zmiňovanou v souvislosti

s kvantifikací cfDNA v moči, a v review Tan et al. Novel urinary biomarkers for detection of bladder cancer (Tan et al. 2018). Poslední citace je v metodické práci, která referuje o rozdílech v izolaci ucfdDNA různými komerčně dostupnými kity a ve které na základě naší práce Streleckiene et al. pracují s druhou ranní močí (Streleckiene et al. 2018).

4.1.4 Druhá část studie – výzkum miRNA

4.1.4.1 Metodika

Tato část studie by zacílena na výzkum miRNA. Celkově bylo zpracováno 109 vzorků druhé ranní moči, 73 od pacientů s karcinomem močového měchýře, 31 od zdravých osob a 5 od pacientů s benigním urologickým onemocněním nezánnětlivého charakteru. Podmínky odběru a zpracování druhé ranní moči byly stejné jako v předchozí části studie, s jediným rozdílem, že pro stabilizaci vzorku byl použit RNA Later (Ambion, Life Technologies). Izolace miRNA byla provedena pomocí Urine microRNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation).

Primárně jsme se zaměřili na analýzu obsahu jednotlivých miRNA v moči u osob napříč celým populačním spektrem, tedy na miRNA detekovatelné v moči všech osob bez ohledu na pohlaví, věk a zdravotní stav. Pro tuto část výzkumu jsme použili vzorky 70 osob (45 mužů, 25 žen, věkové rozmezí 20 - 84 let, 15 zdravých osob, 5 pacientů s neonkologickým urologickým onemocněním, 50 pacientů s karcinomem močového měchýře). Po izolaci miRNA byla provedena reverzní transkripce pomocí TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit s Megaplex RT Primers Human Pool A v2.1 a preamplifikace TaqMan MicroRNA Preamplification s Megaplex PreAmp Primers Human Pool A v2.1. Metodou real-time PCR na přístroji 7900HT Fast Real Time PCR byl s použitím technologie TaqMan Array Human MicroRNA Card A v2.1 (všechny reagenty i přístroj - Life Technologies) sledován obsah 381 miRNA.

Vlastní výzkum miRNA u karcinomu močového měchýře byl rozdělen na tři části. Pro první bylo použito 59 vzorků (46 pacientů, 13 zdravých) z předešlého primárního výzkumu s použitím TaqMan Array Human MicroRNA Card A v2.1. Z analýzy byly vyjmuty vzorky pacientů s pozitivní bakteriurií a leukocyturií. Byly hodnoceny rozdíly v hladinách

381 miRNA. Toto široké spektrum umožnilo vyhodnotit nejvíce alterované miRNA a zároveň vybrat vhodné miRNA pro normalizaci v dalších analýzách.

Ve druhé fázi projektu byly zkoumány vzorky stejných osob jako v první fázi, ale zaměřili jsme se na vybraných 13 miRNA, které byly analyzovány samostatně jednotlivými TaqMan MicroRNA Assays. Zde byla prováděna reverzní transkripce pomocí TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit s TaqMan MicroRNA Assays (vše Life Technologies).

Závěrečná třetí fáze projektu ověřovala stejnou metodou 13 miRNA na souboru nových 50 osob (27 pacientů s karcinomem močového měchýře, 18 zdravých osob a 5 pacientů s benigním urologickým onemocněním nezářlivého charakteru). V této fázi nebyly zařazeny vzorky žádných pacientů s pokročilými stadii tumoru (pT3, pT4), aby bylo možno analyzovat situaci u nižších stadií, z klinického hlediska důležitější pro včasnou diagnostiku.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programů ExpressionSuite v1.0.2 (Life Technologies), qBase v2.4 (Biogazelle), STATISTICA verze 10 (StatSoft), G*Power version 3.1.9.2 (Franz Faul, Universität Kiel) a The Waikato Environment for Knowledge Analysis software (University of Waikato). Pro bioinformatickou analýzu byly použity databáze miRWalk (Dweep et al. 2014) a DAVID (Huang et al. 2009).

4.1.4.2 Výsledky

Na základě porovnání 70 vzorků osob odlišného věku, pohlaví a zdravotního stavu jsme vyhodnotili 30 miRNA, které jsou ve vzorku moči detekovatelné nezávisle na uvedených skutečnostech. Jedná se o miRNA : let-7c, let-7e, miR-100, miR-106a, miR-125b, miR-146a, miR-146b-5p, miR-17, miR-191, miR-192, miR-194, miR-197, miR-19b, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-204, miR-21, miR-24, miR-26a, miR-27b, miR-28-3p, miR-29a, miR-30b, miR-30c, miR-31, miR-532-3p, miR-886-3p, miR-886-5p, miR-99b. Naše výsledky jsme potom v databázi miRWalk porovnali s dostupnými daty o expresi miRNA v tkáních ledvin, genitourinárního traktu a v plazmě. Jednotlivé miRNA expresní soubory se vzájemně prolínají a pouze 3 miRNA (miR-532-3p, miR-886-3p a miR-886-5p) z vybraných 30 nebyly dosud detekovány jinde než v moči (graf 11).

Poté jsme postoupili k hledání vhodného markeru karcinomu močového měchýře. Nejprve jsme tedy analyzovali široké spektrum 381 miRNA. Za použití programu geNorm byly

vybrány 3 miRNA (miR-191, miR-28-3p, miR-200b) vhodné pro normalizaci hladin miRNA v dalších částech projektu. Zároveň bylo vybráno 13 miRNA s největšími rozdíly mezi pacienty a kontrolami, a to za použití dvou nezávislých normalizačních metod (srovnání k průměru uvedených tří miRNA a ke globálnímu průměru).

Ve druhé fázi byly potom rozdíly v expresi vybraných miRNA verifikovány jinou detekční metodou. Deset z těchto miRNA (miR-30b, miR-99a, miR-125b, miR-204, miR-532-3p, let-7c, miR-16, miR-425, miR-93, miR-199a-3p) bylo ověřeno jako statisticky významné. Zároveň bylo provedeno porovnání mezi skupinami pacientů s invazivním (pT2 – pT4, 24 osob) a povrchovým (pTa + pT1, 22 osob) typem nádoru. Obě tyto skupiny se v uvedených miRNA lišily od zdravých kontrol, ale mezi sebou se nelišily v žádné z nich.

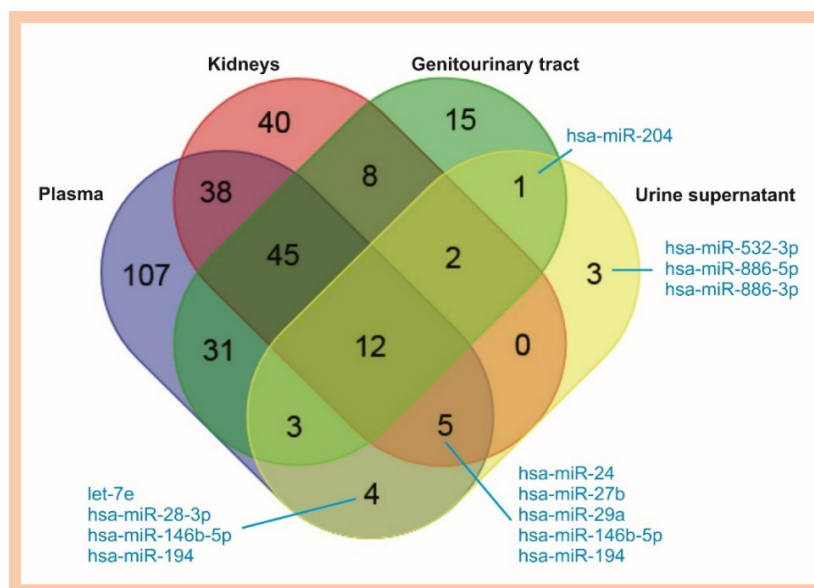
V poslední fázi jsme předcházející výsledky verifikovali na novém souboru osob. Rozsah souboru pro tuto část byl určen power analýzou. Statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test, Benjamini-Hochbergova korekce) byly zjištěny u 5 miRNA: miR-30b ($p = 0,0002$), miR-99a ($p = 0,0019$), miR-125b ($p < 0,0001$), miR-204 ($p = 0,0001$) a miR-532-3p ($p = 0,0031$). Hladiny všech rozdílných miRNA byly u pacientů s karcinomem snižené (graf 12). Mezi hladinami miR-99a a miR-125b byla nalezena statisticky významná korelace ($r = 0,89$, $p < 0,0001$). V bioinformatické analýze se posléze ukázalo, že obě regulují velkou skupinu genů, které hrají důležitou úlohu v kancerogenezi, zvláště pak u karcinomu močového měchýře.

U jednotlivých miRNA byly konstruovány ROC křivky, hodnoty AUC byly v intervalu 0,7 - 0,8. Kombinací výsledků 4 miRNA v rozhodovacím schématu lze dosáhnout vyšetření s 80% senzitivitou, 71% specifitou a $AUC = 0,836$.

Srovnání výsledků jednotlivých skupin pacientů podle stadia onemocnění nebylo provedeno, protože potřebná velikost souboru by byla příliš velká a nebylo by možné v omezeném časovém horizontu shromáždit dostatečný počet pacientů v jednotlivých skupinách.

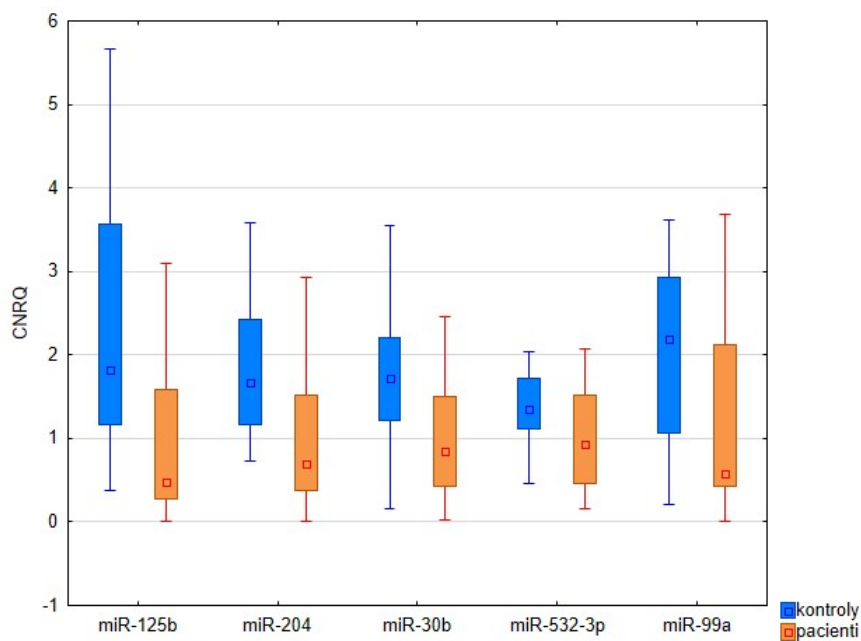
Graf 11

Vennův diagram ukazující průniky skupin miRNA, které jsou v literatuře referovány jako hojně zastoupené v plazmě, ledvinách a genitourinárním traktu, s naším souborem miRNA detekovaných ve všech vzorcích moči bez ohledu na věk, pohlaví a zdravotní stav osoby. Graf převzat z publikovaného článku (Pazourkova et al. 2016).



Graf 12

Krabicový graf kvantifikace vybraných miRNA v moči u pacientů s karcinomem močového měchýře a zdravých osob. Osa Y - relativní množství (CNRQ – calibrated normalized relative quantities) při normalizaci pomocí tří miRNA (miR-191, miR-28-3p, miR-200b). Čtvereček označuje medián, box horní a dolní kvartil (25 % – 75 %), svorky rozsah neodlehých hodnot.



4.1.4.3 Diskuse

Bylo nalezeno 30 miRNA, které jsou součástí miRNA profilu v moči všech osob bez ohledu na jejich pohlaví, věk a zdravotní stav. O většině z nich bylo podle databáze miRWalk v době provádění studie referováno jako o exprimovaných v plazmě nebo tkáni ledvin, takže do moči se mohou dostávat z plazmy transferem přes filtrační systém ledvin nebo přímo z jejich tkáně. Pouze 3 z nich nebyly detekovány ani v tkáni ledvin ani v plazmě, tudíž lze spekulovat o jejich původu v moči ze spodních částí genitourinárního traktu.

Další zajímavé srovnání bylo s prací Silva et al. (Silva et al. 2015), která se zabývá miRNA jako potenciálními biomarkery jednotlivých tělních tekutin pro forenzní účely. Zvláštní je, že ve srovnávacím výčtu tekutin zcela chybí moč. Dle našich výsledků potom většina miRNA, které jsou referovány jako vhodné pro odlišení plasmy nebo venózní krve, byla detekována i ve vzorcích moči u různého počtu zkoumaných osob (nejméně 2, nejvíce 70). Také zde vidíme možnost transferu těchto miRNA přes ledviny do moči.

Jádrem studie bylo zjištění změn miRNA profilu u pacientů s karcinomem močového měchýře. Bylo nalezeno 5 nejvíce alterovaných miRNA, jejichž hladiny byly u pacientů oproti zdravým osobám snižené. Jedná se o miR-30b, miR-99a, miR-125b, miR-204 a miR-532-3p.

Naše výsledky jsou v souladu s předchozími publikovanými studiemi. Častěji jsou citovány snižené hladiny miR-99a a miR-125b a to nejen v supernatantu, ale i přímo v tkáni nádoru a plazmě (Lin et al. 2009, Feng et al. 2014, Zhang et al. 2014, Zhou et al. 2015). U miR-125b byl prokázán její inhibiční vliv na růst nádoru transfekčním experimentem (Huang et al. 2011). Autoři této studie to vysvětlují jejím cílením na onkogen E2F3. Feng et al. (Feng et al. 2014) referují o snížené expresi miR-99a v plazmě nemocných s karcinomem močového měchýře i přímo v jeho tkáni. Geny pro obě tyto miRNA leží ve společném clusteru na chromozomu 21 (Calin et al. 2004) a v naší studii jejich hladiny vzájemně korelovaly jak u pacientů, tak u zdravých osob. Také bioinformatická analýza potvrdila jejich účast ve vývoji karcinomu močového měchýře a ukázala jimi ovlivňované geny, které by mohly souviset s karcinogenním působením kouření u nádorů močového měchýře (Besaratina and Tommasi 2013). Bohužel složení našeho souboru neumožňovalo statisticky validní analýzu rozdílů mezi skupinami kuřáků a nekuřáků.

Down-regulace miR-204 byla nalezena ve tkáni nádoru (Catto et al. 2009, Yoshino et al. 2011) i v močovém sedimentu (Yoshino et al. 2011), ale o jejím obsahu v supernatantu dosud nebyla podána žádná zpráva.

Práce o expresi miR-30b u pacientů s karcinomem močového měchýře jsou ve svých výsledcích značně heterogenní a lze v nich najít údaje o snížených (Wszolek et al. 2011), zvýšených (Mahdavinezhad et al. 2015, Mahdavinezhad et al. 2015) i nealterovaných (Wei et al. 2015) hladinách této miRNA.

O miR-532-3p nehovoří v souvislosti s karcinomem močového měchýře žádná publikace. V onkogenetice je ale například prokázáno její zvýšení ve tkáni nádoru jícnu (Zhao et al. 2013).

Vzhledem k vyšší incidenci karcinomu u mužů než u žen jsme porovnávali také expresi miRNA v těchto dvou skupinách navzájem, ale nenalezli jsme žádné statisticky významné rozdíly.

Ze závěrečného zhodnocení naší práce vyplývá, že najít jednu konkrétní miRNA v moči, která by byla použitelná jako jednoznačný marker karcinomu močového měchýře, zřejmě nebude jednoduché, ne-li nemožné. V současnosti používaná diagnostika by mohla být rozšířena o vzájemnou kombinaci několika miRNA, ale pro tento účel je třeba dalšího výzkumu a zpřesnění výsledků.

Článek byl dosud 10x citován. Čtyřikrát se jednalo o review shrnující úlohu miRNA v patogenezi karcinomu močového měchýře. Pop-Bica et al. (Pop-Bica et al. 2017) cituje down-regulaci miR-125b. Liu et al. (Liu et al. 2017) a Wiecezorek et al. (Wiecezorek and Reszka 2018) uvádějí výsledky našeho článku v souvislosti s přehledem potenciálních biomarkerů pro detekci karcinomu močového měchýře. Dong et al. (Dong et al. 2017) má ve svém review přehlednou tabulku všech dosud publikovaných změn u jednotlivých miRNA. Z ní vyplývá, že naše nálezy se shodují s dalšími studiemi. Souhrnné review Wu et al. analyzuje biomarkery v moči se zřetelem ke karcinomu prostaty (Wu et al. 2017). Review Tan et al. shrnuje poznatky o nových biomarkerech močového měchýře (Tan et al. 2018). Další citace je v úvodu práce skupiny Matsuo et al. (Matsuo et al. 2017), která zkoumala změny exprese hemoxygenázy, proteinu spojeného s odpovědí na stres, u pacientů s karcinomem močového měchýře. Exprese tohoto proteinu je spojena s maligním potenciálem a špatnou prognózou u různých druhů nádorů. Práce skupiny Smith et al. (Smith et al. 2017) popisuje možnost detekce miRNA izolovaných z moči pomocí elektrochemické

metody hybridizace. Zde je naše studie uváděna jako příklad výzkumu alterací miRNA u karcinomu močového měchýře. Wang et al. (Wang et al. 2018) věnují pozornost roli jedné konkrétní miRNA - miR-940 - ve vývoji karcinomu močového měchýře. Je popsána její zvýšená exprese v buňkách nádorové tkáně, jež zvyšuje proliferaci a migraci buněk, invazivitu nádoru a v buňkách inhibuje apoptózu. Toto navýšení exprese je spojeno se zvýšenou expresí proteinů Wnt/ β -kateninové dráhy (například c-Myc, cyklin D1, β -katenin). Naše práce je opět uváděna jako možnost využívat miRNA jako biomarkery karcinomu močového měchýře. Zmínka je i v úvodu práce Zaporozhchenko et al. zabývající se výzkumem miRNA u onemocnění prostaty (Zaporozhchenko et al. 2018).

Jednou citován byl i článek mapující profil miRNA v moči u všech osob a možnosti původu těchto miRNA, a to sice v review Barreiro et al. (Barreiro and Holthofer 2017), kde je zmíněn právě v souvislosti s možným průchodem miRNA z krevní cirkulace do moči.

4.1.5 Závěr

V první části našeho výzkumu volných NA v moči jsme se zaměřili na DNA. Z hlediska její kvantifikace se jako vhodná jeví metoda stanovení celkového množství ucfDNA, které se neliší mezi jednotlivými odběry v průběhu dne. Z hlediska možného přínosu k diagnostice karcinomu močového měchýře má ale měření obsahu ucfDNA podobnou senzitivitu a specifitu jako standardně používané cytologické vyšetření močového sedimentu. Vyšší hladiny ucfDNA byly detekovány u pacientů s invazivními stadii nádoru, ale u pacientů s neinvazivními tumory jsou srovnatelné s hladinami u zdravých osob, a neumožňují tedy jejich odlišení.

Ve druhé části byla věnována pozornost volným miRNA v močovém supernatantu. Nejprve bylo určeno spektrum miRNA, které se vyskytují v moči všech osob bez ohledu na pohlaví, věk a zdravotní status osoby. Dále bylo nalezeno a validačními experimenty ověřeno 5 miRNA (miR-30b, miR-99a, miR-125b, miR-204 a miR-532-3p), jejichž hladiny se liší u nemocných a zdravých osob. Jejich vhodnou kombinací by bylo možno vytvořit algoritmus pro diagnostiku onemocnění, ovšem schéma je poměrně složité a pro praktické použití zatím, i vzhledem k náročnosti metody a její ceně, není vhodné.

4.1.6 Příloha 3 – články

K této části práce byly publikovány tři články, které jsou přiloženy na následujících stránkách.

4.1.6.1 Urinary cell-free DNA quantification as non-invasive biomarker in patients with bladder cancer

Autoři: Antonín Brisuda, Eva Pazourková, Viktor Soukup, Aleš Hořínek, Jan Hrbáček, Otakar Čapoun, Iveta Svobodová, Šárka Pospíšilová, Marie Korabečná, Jaroslav Mareš, Tomáš Hanuš, Marek Babjuk

Publikováno v Urologia Internationalis v roce 2016

Citace:

Brisuda, A., Pazourkova, E., Soukup, V., Horinek, A., Hrbacek, J., Capoun, O., et al. (2016). Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer. Urol Int 96, 25-31.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

4.1.6.2 Comparison of microRNA content in plasma and urine indicates the existence of a transrenal passage of selected microRNAs

Autoři: Eva Pazourková, Šárka Pospíšilová, Iveta Svobodová, Aleš Hořínek, Antonín Brisuda, Viktor Soukup, Jan Hrbáček, Otakar Čapoun, Jaroslav Mareš, Tomáš Hanuš, Marek Babjuk, Marie Korabečná

Publikováno v *Advances in Experimental Medicine and Biology* v roce 2016

Citace:

Pazourkova, E., Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Brisuda, A., Soukup, V., Hrbacek, J., Capoun, O., Mares, J., Hanus, T., et al. (2016). Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs. *Adv Exp Med Biol* 924, 97-100.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

4.1.6.3 MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection

Autoři: Šárka Pospíšilová, Eva Pazourková, Aleš Hořínek, Antonín Brisuda, Iveta Svobodová, Viktor Soukup, Jan Hrbáček, Otakar Čapoun, Tomáš Hanuš, Jaroslav Mareš, Marie Korabečná, Marek Babjuk

Publikováno v Neoplasma v roce 2016

Citace:

Pospisilova, S., Pazourkova, E., Horinek, A., Brisuda, A., Svobodova, I., Soukup, V., Hrbacek, J., Capoun, O., Hanus, T., Mares, J., et al. (2016). MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection. Neoplasma 63, 799-808.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

5 Volné nukleové kyseliny v těhotenství

5.1 Neinvazivní prenatální diagnostika RhD plodu

5.1.1 Předpoklady a cíle studie

V naší laboratoři je v rámci prenatální diagnostiky rutinně testováno pohlaví plodu z krve matky a RhD plodu u RhD negativních matek rovněž z jejich krve. Obě tato vyšetření jsou prováděna metodou real-time PCR, která je velmi citlivá i pro malá vstupní množství DNA. Nová metoda droplet digital PCR je rovněž deklarována jako vysoce senzitivní, zvláště u materiálů s nízkými koncentracemi detekované sekvence DNA. V rámci této studie jsme chtěli porovnat parametry obou metod, abychom na základě zjištěných skutečností mohli zvážit možnost nahradit stávající techniku neinvazivního prenatálního vyšetření novou metodou.

5.1.2 Teoretický úvod

5.1.2.1 Fetální volná DNA

Průkaz volné fetální DNA (cffDNA) v krvi matky poskytl poprvé v roce 1997 Lo et al. (Lo et al. 1997). Zdrojem cffDNA je převážně placentární trofoblast (Flori et al. 2004), což bylo prokázáno Alberrym et al. v roce 2007 (Alberry et al. 2007) pozorováním hladin cffDNA v krvi matek s neembryonálními těhotenstvími. V krvi matky je detekovatelná již kolem 5. týdne těhotenství, i když pro spolehlivé vyšetření je doporučováno provádět odběr krve až po 10. týdnu gestace (GT) (Lo et al. 1998, Galbiati et al. 2005).

Fetální frakce, tedy podíl cffDNA na celkové volné DNA v krvi matky se pohybuje v relativně širokém rozmezí (Lo et al. 1998) a naměřené hodnoty se liší i v závislosti na použité metodě (Lun et al. 2008). Je závislá hlavně na gestačním stáří plodu, se zvyšujícím se GT stoupá. V 10. GT je průměrně 10,2 %, mezi 10. a 20. týdnem stoupá zhruba o 0,1 % týdně, po 21. GT pak až o 1 % týdně (Wang et al. 2013). Vliv na velikost fetální frakce mají i další faktory, například hmotnost matky (Haghiac et al. 2012) nebo její zvýšená fyzická aktivita (Atamaniuk et al. 2004), při nichž dochází k relativnímu snížení fetální frakce

vzhledem k většímu množství mateřské cfDNA. Zatímco velikost fetální frakce během těhotenství stoupá, celkové množství cfDNA v krvi matky zůstává relativně konstantní (Horinek et al. 2008).

Signifikantně zvýšené hladiny cffDNA nacházíme u některých patologických stavů spojených s graviditou, jako jsou abnormálně invazivní placenta (Sekizawa et al. 2002), intrauterinní růstová retardace plodu (Caramelli et al. 2003), polyhydramnion (Zhong et al. 2000), mimoděložní těhotenství (Lazar et al. 2006), předčasný porod (Leung et al. 1998) nebo aneuploidie plodu (Lo et al. 1999). Jedná se o nespecifický jev, související s růstem a apoptózou trofoblastů a s procesem placentace, které mohou být v těchto případech různě alterovány. Detailně studovanou diagnózou v tomto směru je preeklampsie, u níž je popsáno až pětinasobné zvýšení hladin cffDNA (Lo et al. 1999, Zeybek et al. 2013) oproti zdravým těhotným (Lo et al. 1999). Ke zvýšení dochází už před klinickou manifestací onemocnění (Leung et al. 2001). Navíc se zvyšuje nejen fetální frakce, ale i celková mateřská cfDNA (Zhong et al. 2001), obě v korelaci se závažností patologie (Swinkels et al. 2002).

Po porodu jsou fragmenty cffDNA rychle eliminovány z matčina krevního oběhu, průměrně za 4 – 30 minut, u naprosté většiny osob vymizí do 2 hodin a druhý den po porodu již nebyla cffDNA detekována u žádné pacientky (Lo et al. 1999). Tato skutečnost je velmi důležitá z hlediska možnosti ovlivnění výsledků vyšetření v dalších těhotenstvích.

Analýza cffDNA je využívána v prenatalní diagnostice. Zatímco invazivní metody vyšetření, jako je odběr choriových klků (CVS) a odběr plodové vody (AMC), jsou i v rukou zkušeného odborníka zatíženy jistým, i když v současnosti již velmi nízkým, rizikem poškození plodu a možným narušením průběhu těhotenství, u této neinvazivní diagnostiky pacientku nevystavujeme žádnému riziku, a i psychická zátěž a míra stresu jsou pro ni mnohem nižší (Tabor et al. 2009). V současné době je rutinně prováděna diagnostika RhD plodu a pohlaví plodu z krve matky (Lo et al. 1998, Costa et al. 2002).

Poslední novinkou zaváděnou do rutinní diagnostiky je neinvazivní prenatalní testování (NIPT) pro nejčastější chromozomální aneuploidie – trizomie 13, 18 a 21. Jedná se o vyšetření cffDNA z krve matky metodou NGS. Toto vyšetření je v současnosti indikováno, pokud se riziko stanovené prvotrimestrálním biochemickým screeningem pohybuje mezi 1/101 až 1/500 a současně je u pacientky negativní ultrazvukový nálezn. Pozitivní výsledek NIPT je potom vždy nutné ověřit invazivním vyšetřením (Springer et al. 2018).

5.1.2.2 RhD inkompatibilita

K RhD vyšetření plodu je přistupováno, pokud je matka RhD negativní, takže existuje riziko RhD inkompatibility, pokud by plod byl RhD pozitivní. V takovém případě je těhotenství nutno dále sledovat pro možný rozvoj hemolytické choroby plodu a novorozence (Urbaniak and Greiss 2000). Při ní přecházejí mateřské protilátky anti-D IgG přes placentu do krevního oběhu plodu a ničí fetální erytrocyty (Daniels et al. 2004). To vede k rozvoji anémie, zvýšeným hladinám bilirubinu ve fetálním oběhu a posléze k poškození psychomotorického vývoje plodu. Při RhD inkompatibilitě je nutné monitorovat ultrasonograficky v pravidelných intervalech průtok krve v arteria cerebri media plodu (Mari et al. 2000, Oepkes et al. 2006), neboť při počínající anémii dochází k jeho změnám. V případě plodu RhD negativního, není třeba těhotenství v tomto směru dále sledovat, což ušetří značné finanční prostředky.

V České republice jsou v rámci screeningových vyšetření v prvním trimestru testovány u všech těhotných nepravdělné antierytrocytární protilátky. Asi 5% žen má pozitivní screening, což představuje zhruba 5000 případů ročně. Ovšem jen u 1,5 % (tedy asi u 1500 žen) jsou nalezeny protilátky klinicky významné a pouze u 0,5 % se jedná o aloprotilátku anti-D (cca 500 žen). Rizikových případů, tedy těch, jejichž plod je RhD pozitivní, je zhruba 60 % (300 ročně), zatímco 40 % plodů je RhD negativních (200 ročně) bez rizika inkompatibility (Kratochvilova et al. 2016).

Dalším preventivním opatřením je potom profylaktické antenatální podání anti-D imunoglobulinu (případně podání této protilátky při invazivních výkonech v průběhu těhotenství) všem RhD negativním matkám. Pokud je ovšem plod rovněž RhD negativní, což je v praxi zhruba v jedné třetině těchto gravidit, je tato profylaxe zbytečná a podání anti-D imunoglobulinu není nutné (Clausen et al. 2014).

Gen *RHD* je tvořen 10 exony a je vysoce polymorfní (Garcia et al. 2015). Jeho exprese vede k množství variant RhD epitopů, které se při sérologickém vyšetření mohou jevit jako pozitivní, slabě pozitivní (tzv. weak varianty) a negativní. Osoby s různými weak variantami pak mohou, ale nemusí být v riziku aloimunizace (Wagner et al. 2001, Luo et al. 2018). První studie cffDNA genotypizace *RHD* plodu byly zaměřeny pouze na detekci jednoho z exonů genu *RHD* (Lo et al. 1998, Costa et al. 2002). Posléze byly analýzy rozšířeny na dva i více exonů z důvodu snížení možné chybovosti, protože přidáním jednoho exonu se snížila chyba výsledku z 1 % na 0,01 % (Chan et al. 2001). Nejčastěji je detekována kombinace exonů 5, 7

a 10 (Clausen et al. 2014), i když poslední rozsáhlá retrospektivní studie Vivanti et al. (Vivanti et al. 2016) ukazuje dostatečnou výpovědní hodnotu vyšetření i při použití pouze jednoho exonu (exon 10). Exony 7 a 10 obsahují specifické sekvence odlišující geny *RHD* a *RHCE*. Exon 5 odlišuje varianty *RHD* Ψ (Clausen et al. 2005, Grootkerk-Tax et al. 2006).

5.1.2.3 Droplet PCR

Tato relativně nová metoda detekce DNA fragmentů je založena na emulzní PCR, kdy každá jednotlivá PCR reakce probíhá v odděleném prostředí kapky o objemu měřeném v nanolitrech. Každý vyšetřovaný vzorek je rozdělen do desetitisíců takovýchto kapek („droplets“), které tvoří emulzní roztok. Základem je primární naředění vzorku tak, aby ve většině kapek byla jedna kopie DNA nebo byly prázdné (bez molekuly DNA). Po proběhlé reakci jsou vyhodnoceny počty prázdných kapek bez pozitivního signálu a kapek s DNA (signál přítomen). Na základě statistické analýzy pomocí Poissonovy distribuce je potom vypočítáno množství DNA kopií v reakci. Na rozdíl od klasicky používané metody real-time PCR, při které je kvantifikace hladin DNA relativní, s nutností konstrukce kalibrační křivky, se při této metodě jedná o absolutní kvantifikaci, tedy o přímou detekci konkrétního množství molekul DNA ve vzorku. Metoda je vysoce senzitivní a je zvláště doporučována pro analýzy vzorků s extrémně nízkým obsahem analyzované DNA, například vyšetření virové DNA nebo CNV (Diehl and Diaz 2007, Hindson et al. 2011). Zdá se tedy, že by mohla být přínosem i pro neinvazivní prenatalní diagnostiku (Fan and Quake 2007, Lo et al. 2007, Zimmermann et al. 2008, Tsui et al. 2013) založenou na detekci velmi malé fetální frakce volné DNA na převažujícím pozadí cfDNA matky.

5.1.3 Metodika

Naše studie byla rozdělena na tři části. Nejprve byla metodika zavedena na vzorcích standardní DNA (v 8 ředěních v rozsahu 2 – 0,015 ng/μl).

Ve druhé části byly analyzovány vzorky plazem 10 netěhotných žen RhD pozitivních. U nich pochází detekovaná sekvence genu *RHD* z jejich buněk, jedná se o klasickou cfDNA a

její množství bude řádově odpovídat obsahu druhé analyzované sekvence, referenčnímu genu *GAPDH*.

Poslední třetí část, která byla pro naše výstupy zásadní, bylo vyšetření 35 vzorků plazem RhD negativních gravidních žen (12. – 36. GT). Pokud je v těchto vzorcích zachycena *RHD* sekvence, jedná se fetální cfDNA, jejíž obsah se pohybuje v mnohem nižších koncentracích a řádově odpovídá velikosti fetální frakce.

Krevní skupina Rh byla u všech žen a posléze i novorozenců určena sérologicky. U žen byla potvrzena i analýzou DNA z bukalního stěru pro možnost sérologické negativity nebo slabé, špatně zachytitelné, positivity u geneticky *RHD* pozitivních žen. S touto situací se v naší praxi setkáváme u cca 8 % těhotných a vyšetření potom nelze vyhodnotit a je uzavíráno jako neinformativní.

Všechny vzorky byly analyzovány klasickou metodou real-time PCR a testovanou metodou ddPCR. Jako pozitivní byly hodnoceny výsledky s více než 5 replikáty (z devíti analyzovaných) s amplifikací DNA, jako negativní s žádným replikátem s amplifikací *RHD* sekvence.

Izolace cfDNA byla prováděna z 1 ml plazmy pomocí QiaAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). Pro vlastní analýzu byly v obou metodách používány stejné primery a sondy (vše Life Technologies). Jako referenční gen byl použit gen *GAPDH*. Pro určení RhD plodu byly analyzovány 3 exony genu *RHD* (exon 5, 7, 10), které jsou standardně používány při naší rutinní diagnostice. PCR reakce byly prováděny jako duplexní (*RHD* exon 5 + *RHD* exon 7, *RHD* exon 10 + *GAPDH*). Všechny tři exony byly testovány v triplikátech, což znamená, 9 replikátů referujících o RhD statusu u každého vzorku.

Pro analýzu qPCR byl použit TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies). Analýza byla provedena na přístroji 7900HT Fast Real Time PCR (Life Technologies) metodou relativní kvantifikace s využitím softwaru SDS v2.4. Standardní křivka byla konstruována na základě ředění standardní DNA (TaqMan Control Genomic DNA, Life Technologies).

Při ddPCR analýze byl používán ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad). Emulzní reakce probíhala na přístroji QX100 Droplet Generator, vlastní amplifikace na Bio-Rad T100 Thermal Cycler a detekce na QX100 Droplet Reader (vše Bio-Rad). Výsledky byly evaluovány programem QuantaSoft Software version 1.2.10.0.

Výsledky obou metod byly vzájemně porovnávány. Pro statistické vyhodnocení byl použit program STATISTICA verze 10 (Statsoft).

5.1.4 Výsledky

5.1.4.1 Porovnání výsledků obou metod při použití standardní DNA

Pro vzájemné porovnání obou metod byly použity výsledky měření ve stejných jednotkách koncentrace – ng/μl. V případě relativní kvantifikace metodou real-time PCR získáváme výsledek přímo v těchto jednotkách. U ddPCR se jedná o kvantifikaci absolutní a bylo nutno počet kopií převést na jednotky koncentrace. Pro převod byl použit vzorec $1 \text{ GE}/\mu\text{l} = 2 \text{ kopie}/\mu\text{l} = 6,6 \text{ pg}/\mu\text{l}$ (GE – genomický ekvivalent).

Nejprve jsme se zaměřili na porovnání parametrů jako je detekční limit, linearita a přesnost měření získaných analýzou vzorků různě naředěné standardní DNA. Obě metody měly stejně nízký detekční limit. Všechny vzorky až do nejnižšího ředění (0,015 ng/μl, celkově v reakci 5 μl, tedy 0,075 ng DNA v reakci) byly bez problémů analyzovány. U ddPCR byly jednotlivé replikáty od sebe méně odlišné, což bylo zvláště patrné u *RHD* exonu 10, kde se i statisticky významně lišily variační koeficienty obou metod (Mann-Whitneyův test, $p = 0,0009$). Variabilita replikátů se v případě obou metod zvyšovala se snižující se koncentrací analyzované DNA. Linearita byla u obou metod výborná s regresním koeficientem (R^2) standardní křivky blízko 1 u všech analyzovaných genů (qPCR/ddPCR R^2 - *GAPDH* 0,9937/0,9927, *RhD5* 0,9957/0,9949, *RhD7* 0,9951/0,9952, *RhD10* 0,9811/0,9953).

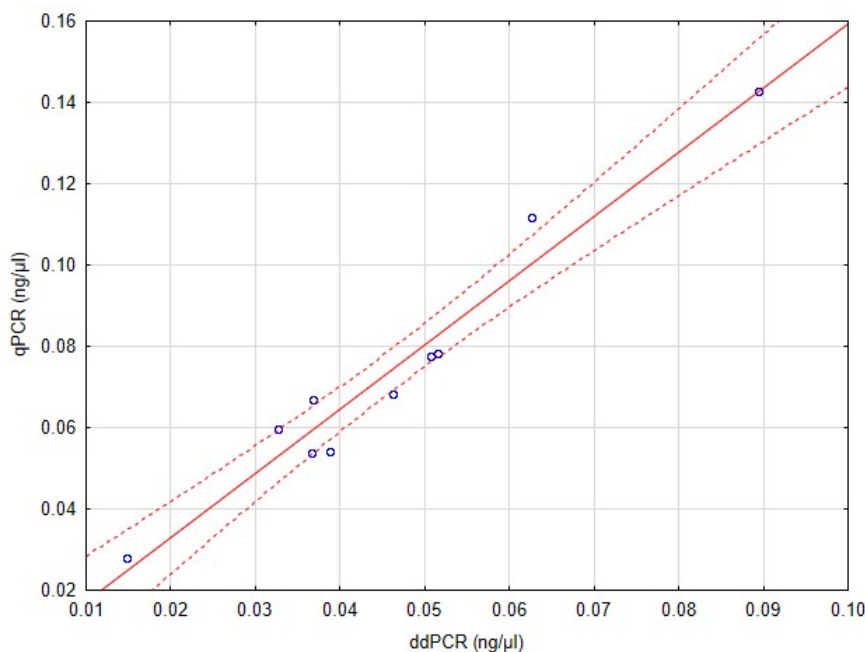
5.1.4.2 Porovnání výsledků obou metod na klinických vzorcích

V této části jsme použili pro první porovnání výsledků metod 10 vzorků netěhotných RhD pozitivních žen. Ověřili jsme závěry z předcházejících pokusů a získaly podobné výstupy jako při použití vzorků standardní DNA. Koncentrace naměřené oběma metodami se mírně lišily, ale u všech detekovaných sekvencí byla mezi výsledky obou měření prokázána silná korelace (graf 13). Odchylny mezi replikáty byly opět o něco nižší u ddPCR (ovšem bez statisticky významných rozdílů).

Následovala nejdůležitější, poslední část pokusů, tedy porovnání vzorků těhotných žen RhD negativních. V této fázi bylo analyzováno 35 vzorků, z toho 25 mělo RhD pozitivní fetální DNA, 10 plodů bylo RhD negativních. RhD status byl ověřen sérologicky po narození dítěte. U všech RhD pozitivních vzorků bylo z analyzovaných 9 replikátů vždy nejméně 7 replikátů pozitivních. Absolutní koncentrace cfDNA (detekce genu *GAPDH*) byly stejné u obou metod, koncentrace fetální cfDNA (3 exony genu *RHD*) se lišily, ale výsledky obou metod vzájemně korelovaly (tabulka 2). Podíl fetální frakce, určený jako poměr množství exonu 10 *RHD* k množství genu *GAPDH*, byl u ddPCR průměrně 15,7 %, u qPCR byl nižší – pouze 9,8 %. U obou metod byla velikost fetální frakce v korelaci s gestačním stářím plodu (graf 14).

Graf 13

Graf korelaci mezi hodnotami koncentrace cfDNA (exon 5 genu *RHD*) naměřenými oběma metodami, tedy qPCR a ddPCR. Korelační koeficient $r = 0,9776$, p hodnota 0,000001.



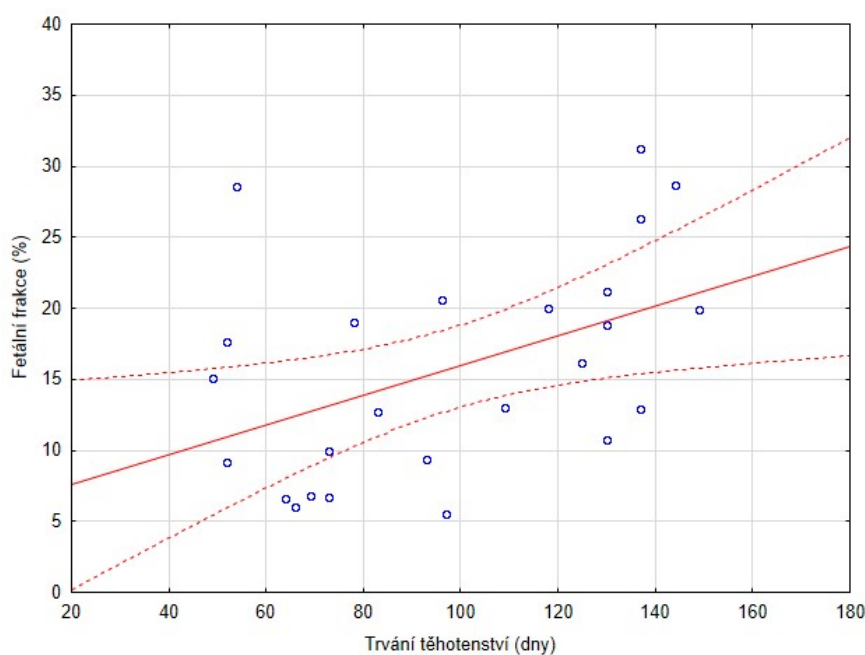
Tabulka 2

Tabulka průměrných hodnot koncentrací cfDNA a cffDNA naměřených oběma metodami (ddPCR a qPCR) a vzájemných korelací těchto hodnot. Koncentrace cfDNA jsou určovány kvantifikací genu GAPDH u 35 vzorků RhD negativních matek. Koncentrace cffDNA jsou stanoveny měřením RHD genu (průměr ze tří analyzovaných exonů) u 25 vzorků RhD negativních matek s RhD pozitivním plodem. Všechny koncentrace jsou udány v ng/μl.

	průměrná koncentrace (ng/μl)		korelační koeficient r	p hodnota
	ddPCR	qPCR		
cfDNA	0,088	0,089	0,98669	0,00004
cffDNA	0,006	0,004	0,93366	0,00069

Graf 14

Graf korelací mezi hodnotami fetální frakce a délkou trvání těhotenství udanou v gestačních týdnech. Pro měření fetální frakce byla použito měření exonu 10 genu RHD metodou ddPCR, hodnoty udány jako % celkového obsahu cfDNA. Korelační koeficient $r = 0,45936$, p hodnota 0,0208.



5.1.5 Diskuse

Amplifikace všech čtyř detekovaných úseků byla úspěšná u obou metod a obě také prokázaly dostatečnou senzitivitu i pro nízké koncentrace vstupního materiálu. U obou byla také stejně dobrá linearita a regresní koeficient pro standardní křivky byl u všech reakcí blízko 1. U droplet PCR nacházíme menší variabilitu replikátů u všech detekovaných sekvencí. Tato variabilita byla v případě exonu 10 u *RHD* genu dokonce statisticky významně odlišná ve srovnání s výsledkem metody real-time PCR.

Celkově se ddPCR ve všech ohledech jeví jako mírně přesnější a preciznější (menší standardní odchylky a koeficienty variace u replikátů, vyšší regresní koeficient u standardních křivek). Všechny tyto rozdíly mezi oběma metodami jsou ale naprosto minimální. Naše závěry jsou v souladu s výsledky jiných skupin (Sanders et al. 2011, Bharuthram et al. 2014). Zjištěné hodnoty fetální frakce jsou nepatrně vyšší, než by vyplývalo z předchozích studií (Lo et al. 1998, Lun et al. 2008), zvláště u ddPCR, u obou metod ale korelují s gestačním stářím plodu.

Na druhou stranu je metoda ddPCR časově náročnější a z hlediska laboratorní práce složitější. Také její vyhodnocování je komplikovanější, protože v případě tak nízkých koncentrací detekovaných sekvencí DNA, s jakými pracujeme v rámci neinvazivní prenatální diagnostiky, musí být prahová hodnota (threshold) nastavena ručně. Počet pozitivních signálů je totiž velice nízký, někdy i v řádu jednotek, proto nelze použít automatické softwarové stanovení prahové hodnoty. Tato skutečnost pak ale vnáší jistou subjektivitu do hodnocení vzorků, variabilitu výsledků mezi jednotlivými vyšetřeními v téže laboratoři i mezi různými laboratořemi.

Po vyhodnocení všech aspektů, které tato studie přinesla, jsme se rozhodli používat v naší laboratoři i nadále pro rutinní diagnostiku již zavedenou metodu qPCR.

Článek byl dosud 8x citován (Butchbach 2016, De Marchi et al. 2016, Goh et al. 2016, Chang et al. 2016, Witte et al. 2016, Cao et al. 2017, Liu et al. 2017, Ren et al. 2018). Ve všech případech se jedná o citace referující o zkušenostech s novou metodou ve smyslu jejího použití v diagnostice, její vyšší přesnosti než qPCR (Butchbach 2016), ale také určitého negativního aspektu ve formě manuálního stanovení prahové hodnoty při velmi nízkém počtu pozitivních signálů (Witte et al. 2016).

5.1.6 Závěr

Z výsledků naší studie vyplývá, že obě metody mají velmi dobré výsledky se srovnatelnými technickými parametry (detekční limit, linearita, regresní koeficient). U droplet PCR je menší variabilita replikátů, která ukazuje na teoretickou větší přesnost metody. V praxi efekt této pozitivní skutečnosti snižuje složitější pracovní postup a hlavně obtížnější vyhodnocování, které do značné míry závisí na osobě hodnotitele. Nelze tedy zcela objektivně označit jednu z metod za lepší a vhodnější k používání než druhou.

5.1.7 Příloha 4 – článek

K této části práce byl publikován článek přiložený na následujících stránkách.

5.1.7.1 Performance of droplet digital PCR in non-invasive fetal RHD genotyping – comparison with a routine real-time PCR based approach

Autoři: Iveta Svobodová, Eva Pazourková, Aleš Hořínek, Michaela Novotná, Pavel Calda, Marie Korabečná

Publikováno v PLoS one v roce 2015

Citace:

Svobodova, I., Pazourkova, E., Horinek, A., Novotna, M., Calda, P., and Korabecna, M. (2015). Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping - Comparison with a Routine Real-Time PCR Based Approach. PloS one 10, e0142572.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

5.2 Antifosfolipidový syndrom

5.2.1 Předpoklady a cíle studie

V rámci naší rutinní praxe v prenatální diagnostice jsme denně konfrontováni s různými těhotenskými komplikacemi a rizikovými stavy, které průběh gravidity ztěžují, až znemožňují. Snahou všech odborných pracovníků, kteří se podílí na prenatální péči, je samozřejmě snižování rizika primárních onemocnění rodiček a umožnění fyziologického průběhu gravidity co nejširšímu spektru pacientek. S tím souvisí i neustálé rozšiřování znalostí o patofyziologii konkrétních chorob a jejich modifikaci při těhotenství. Jednou z primárních afekcí, která má velmi nepříznivý vliv na schopnost donosit zdravý plod je antifosfolipidový syndrom (APS). Díky spolupráci s Fakultní nemocnicí Plzeň se nám podařilo získat unikátní vzorky krve léčených pacientek s APS ve třetím trimestru těhotenství. Cílem naší studie bylo zjistit, jestli jsou významné rozdíly v obsahu volné DNA v plazmě u těchto pacientek oproti zdravým těhotným.

5.2.2 Teoretický úvod

5.2.2.1 Antifosfolipidový syndrom

Antifosfolipidový syndrom je autoimunitní onemocnění spojené s tvorbou různých orgánově nespecifických autoprotilátek proti fosfolipidovým antigenům (APA), např. fosfatidylserinu, fosfatidyletanolaminu, kardiolipinu, annexinu V (Miyakis et al. 2006). Jako primární APS označujeme stav bez přítomnosti jiného onemocnění, které by bylo spojeno s tvorbou protilátek. APS může vzniknout i sekundárně, nejčastěji při SLE. Pro diagnózu je nutná přítomnost alespoň jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria (Wilson et al. 1999). Klinické příznaky zahrnují trombózy a poruchy těhotenství, signifikantním laboratorním nálezem je opakovaný průkaz alespoň jedné z daných protilátek (Hanly 2003).

APA způsobují hyperkoagulační stav. Jedná se o jednu z nejčastějších získaných příčin trombofilie. Vznikající uzávěry v arteriálním i venózním řečišti jsou příčinou různých patologií, přičemž nejčastěji se manifestují jako hluboké žilní trombózy, CMP a plicní

embolie (Cervera et al. 2015). Jsou také důležitou příčinou komplikací v těhotenství (Levine et al. 2002).

5.2.2.2 APS a těhotenství

Těhotenství samo o sobě představuje sice fyziologický, ale přesto trombofilní stav. Branch proto nazývá graviditu speciální šancí na klinickou manifestaci nemocných s APA (Branch 1994). Byla popsána řada mechanismů, kterými APS negativně ovlivňuje průběh gravidity. Jedná se o změny placentace a intertrofoblastické fúze, ovlivnění apoptózy, aktivace endoteliálních buněk a trombocytů, předčasné cévní okluze v placentě a další (Ulcova-Gallova 2005, Shoenfeld et al. 2006, Carp and Shoenfeld 2007, Andreoli et al. 2013, Schreiber et al. 2018). Patogeneze se přímo účastní APA, které se váží k negativně nabitým fosfolipidům na povrchu trombocytů a cévního endotelu, čímž vedou k placentárním trombózám a mikroinfarktům, poruchám cirkulace a krevního zásobení plodu. Navíc způsobují i netrombotické poškození plodu svojí vazbou na antigeny placenty a syncytiotrofoblastu a narušením procesu apoptózy. Tyto procesy vedou k aktivaci prozánětlivých faktorů, které významně ovlivňují průběh těhotenství. Proto je také základem terapie těhotné s APS podávání antikoagulační a protizánětlivé léčby (Derksen et al. 2004, Tempfer et al. 2006, Danza et al. 2012).

Placentární insuficience, růstová retardace plodu (Yamada et al. 2009, Cervera et al. 2015) a preeklampsie (Duckitt and Harrington 2005, Clark et al. 2007, do Prado et al. 2010) jsou nejčastějšími komplikacemi v průběhu gravidity u žen s APA. Z dalších maternálních komplikací se častěji vyskytují HELLP syndrom (hemolysis, elevated liver enzyme, low platelets) (Clark et al. 2007) a chorea gravidarum (Karageyim et al. 2002). Opakované potraty po 10. GT jsou spojeny s nálezem APA až v 80 % (Oshiro et al. 1996). Časté jsou také předčasné porody s narozením mrtvého nebo nezralého plodu (Silver et al. 2013).

V době provádění tohoto výzkumu na našem pracovišti jsme nenašli žádnou publikaci, která by cíleně hodnotila hladiny cfDNA u pacientek s APS. Pouze jedna studie Hristoskova et al. (Hristoskova et al. 2004), jež se zabývala analýzou antifosfolipidových a anti-DNA protilátek u pacientek s preeklampií, hovoří v této souvislosti i o obsahu cfDNA. Z jejích závěrů vyplývá, že nebyly nalezeny žádné korelace mezi hladinou cfDNA a daných protilátek.

5.2.3 Metodika

V této pilotní studii byly k analýze použity vzorky 4 pacientek s primárním APS s opakovanými potraty v anamnéze (3 – 4x), kterým se dosud nenarodilo živé dítě. Jako kontrolní skupina byly použity vzorky 21 pacientek s fyziologickým těhotenstvím. Všechny ženy byly v době odběru ve třetím trimestru těhotenství. Hladiny protilátek u pacientek s APS byly zjišťovány metodou ELISA. Kromě standardní vitaminové suplementace (stejně jako u zdravých pacientek) byly tyto ženy léčeny kyselinou salicylovou a kortikoidy a od 18. týdne gravidity také gestageny. Pro studii byly vybrány pacientky s plodem mužského pohlaví, aby bylo možno na základě detekce genu *SRY* (sex-determinující faktor Y) určit fetální frakci volné DNA.

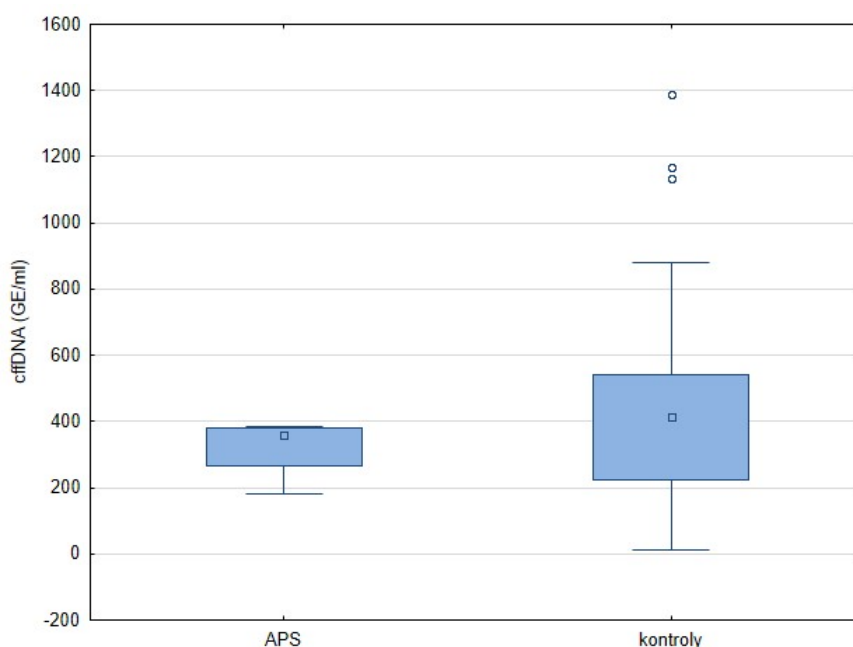
Volná DNA byla z plasmy izolována pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Vlastní analýza proběhla metodou real-time PCR na stroji Gene Amp 5700 Sequence Detection System (Life Technologies) se specifickými primery a sondami pro detekci sekvence *SRY* (Life Technologies). Absolutní kvantifikace byla provedena konstrukcí kalibrační křivky ředěním standardní DNA (Human Male Control DNA 10ng/μl, Promega). Pro statistickou analýzu byly využity program STATISTICA verze 10 (StatSoft) a S.A.S. 8.02 (SAS Institute Inc.).

5.2.4 Výsledky

Medián hodnot cffDNA u zdravých těhotných byl 414,7 GE/ml. Rozsah hodnot byl poměrně široký od 11,7 GE/ml po 1390 GE/ml. Hladiny pacientek s APS se pohybovaly v rozmezí od 181,4 GE/ml do 386,5 GE/ml s mediánem 359,4 GE/ml (graf 15). Naměřené hodnoty se u všech 4 pacientek pohybovaly v rozmezí odpovídajícím intervalu mezi 25. a 75. percentilem u fyziologických těhotenství. Porovnáním obou skupin Mann-Whitneyovým testem nebyla prokázána žádná statisticky významná odlišnost mezi oběma soubory (p - hodnota 0,4363).

Graf 15

Krabicový graf obsahu cfDNA (GE/ml) v plazmě pacientek s APS a zdravých těhotných (kontrol). Čtvereček označuje medián, box horní a dolní kvartil (25 % – 75 %), svorky rozsah neodlehlych hodnot, kroužky odlehlé hodnoty.



5.2.5 Diskuse

V patogenezi procesů, které komplikují průběh těhotenství u pacientek s APS, se uplatňují poruchy apoptózy a aktivace prozánětlivých faktorů. Oba tyto jevy obecně významně zvyšují hladiny cfDNA. Také u těhotných jsou zvýšené hladiny cfDNA považovány za marker poškození syncytiotrofoblastu a zvýšené apoptózy.

Naše analýza neukázala na žádné změny v obsahu fetální volné DNA u léčených pacientek s APS oproti zdravým gravidním ženám. Jedná se ovšem pouze o velmi malý soubor pacientek, takže z tohoto hlediska je samozřejmě statistické vyhodnocení pouze orientační. Přesto lze usuzovat, že pokud je APS dobře zaléčen, může těhotenství probíhat bez větších alterací a obsah cfDNA není významně rozdílný od zdravých těhotných. Této teorii by odpovídal i fakt, že všechny pacientky byly v době odběru již ve třetím trimestru, a to dosud bez závažnějších komplikací. Z etických důvodů samozřejmě neexistuje možnost

eventuálního srovnání výsledků u léčených a neléčených pacientek. Bylo by ovšem velmi zajímavé sledovat hladiny volné DNA u konkrétních pacientek s APS v průběhu celého těhotenství, případně v závislosti na přidružených komplikacích. Tato studie by zřejmě, vzhledem k relativně nízkému počtu pacientek, musela být organizována na základě spolupráce většího počtu pracovišť.

Článek byl zatím jednou citován v rámci souhrnného review o autoimunitních chorobách (Selmi 2015).

5.2.6 Závěr

Naše studie monitorující obsah cffDNA u zdravých těhotných a léčených gravidních pacientek s APS neukázala žádné rozdíly mezi oběma skupinami. Tento fakt lze nejspíše vysvětlit správně nastavenou léčbou u nemocných, která umožnila průběh gravidity bez vážnějších komplikací. Výsledky je nutno brát pouze jako pilotní projekt s vědomím velmi omezené velikosti souboru pacientek s APS a s nutností dalšího podrobného výzkumu.

5.2.7 Příloha 5 – článek

K této části práce byl publikován článek přiložený na následujících stránkách.

5.2.7.1 Quantification of circulating fetal DNA as a tool for potential monitoring of pregnant patients with antiphospholipid antibodies

Autoři: Marie Korabečná, Zdenka Ulčová-Gallová, Aleš Hořínek, Eva Pazourková, Pavel Calda

Publikováno v Autoimmunity v roce 2014

Citace:

Korabecna, M., Ulcova-Gallová, Z., Horinek, A., Pazourkova, E., and Calda, P. (2014). Quantification of circulating fetal DNA as a tool for potential monitoring of pregnant patients with antiphospholipid antibodies. Autoimmunity 47, 473-477.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

Článek dostupný v příloze.

6 Závěrečné shrnutí

Tato práce shrnuje výsledky několikaletého výzkumu volných nukleových kyselin v plazmě a moči. Zkoumali jsme jak množství cfDNA, tak její kvalitativní změny v podobě odlišné metylace promotorů genů. U miRNA byly analyzovány celkové profily s následným ověřením nejvíce odlišných miRNA.

U nefrologických pacientů jsme pozorovali kvalitativní změny cfDNA v průběhu hemodialýzy v podobě odlišné metylace promotorů genů spojených s imunitní a zánětlivou odpovědí organismu. Zjistili jsme, že i v tak krátkém časovém intervalu, kterým HD je, jsou tyto změny monitorovatelné. Jakkoli je nesporně dialýza život zachraňujícím výkonem, jedná se o velmi razantní zásah do organismu, který má samozřejmě i své vedlejší důsledky. Na vybraném souboru pacientů s diabetickou nefropatií bylo potom také zjištěno, že změny exprese genů zapojených do regulace hematopoézy úzce souvisejí s potřebou terapie anémie rekombinantním erythropoetinem a odpovědovostí na léčbu.

Na unikátním souboru párových vzorků pacientů s AML odebraných před léčbou onemocnění a v době první remise jsme zjistili změny profilů miRNA zastoupených v plazmě. Jednalo se o 6 miRNA, které byly v době diagnózy zvýšené a v remisi došlo k jejich poklesu a tedy trendu směrem k normalizaci a nízkým hodnotám, které jsou nacházeny u zdravých osob.

Další velkou studií bylo hledání vhodného neinvazivního markeru karcinomu močového měchýře. Zjistili jsme, že pouhé měření koncentrace cfDNA je pro stanovení jejich hladin v moči nedostatečné a je třeba do výpočtu zahrnout i celkový vymočený objem. Na základě tohoto měření lze potom odlišit pacienty s karcinomem od zdravých osob, ovšem výpovědní hodnota tohoto vyšetření je v podstatě stejná jako u dosud běžně používané cytologie s barvením podle Papanicolaua. Také v profilu miRNA jsou u pacientů nacházeny změny s výrazným snížením především u 5 miRNA. Pro praktické použití by bylo potřeba stanovovat všechny tyto miRNA a používat rozhodovacího schématu na základě všech zjištěných hodnot. V rámci tohoto výzkumu byl rovněž stanoven soubor miRNA, které jsou zastoupeny v moči všech osob, bez ohledu na jejich pohlaví, věk a zdravotní status.

Poslední část výzkumu se nejvíce dotýkala naší rutinní praxe, ve které stanovujeme RhD plodu a jeho pohlaví z krve matky na základě analýzy volné fetální DNA. Zde jsme porovnávali výsledky relativně nové metody droplet digital PCR proti standardně používanému qPCR. Bylo zjištěno, že ddPCR je metodou poněkud přesnější, ovšem

s náročnějším pracovním postupem s větší možností chyb, takže nelze jednoznačně doporučit, která metoda je vhodnější pro praxi.

Krátká zmínka je věnována porovnání hladin cfDNA u gravidních pacientek s antifosfolipidovým syndromem a zdravých těhotných. Zde jsme nezjistili žádné rozdíly v obsahu cfDNA. Je to zřejmě dáno správnou zaléčeností těchto pacientek, což ve své podstatě umožnilo i bezproblémový průběh celého těhotenství.

Závěrem lze podotknout, že přestože od objevu volné DNA letos uplyne 80 let, přináší její výzkum stále jak nové poznatky, tak i množství dalších navazujících otázek, a můžeme konstatovat, že o detailech původu nebo funkce cfDNA víme doposud zřejmě velmi málo.

6.1.1.1

7 Seznam použité literatury

- Al-Yatama, M. K., Mustafa, A. S., Ali, S., Abraham, S., Khan, Z. and Khaja, N. (2001). Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 21(5): 399-402.
- Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., et al. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 27(5): 415-418.
- Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107(7): 823-826.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., et al. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9(3): 277-279.
- Ammerpohl, O., Scheufele, S. and Siebert, R. (2016). Analyses of epigenetic markers in liquid biopsies: information from beyond the genome. *Medizinische Genetik* 28(2): 251-258.
- Andreoli, L., Fredi, M., Nalli, C., Franceschini, F., Meroni, P. L. and Tincani, A. (2013). Antiphospholipid antibodies mediate autoimmunity against dying cells. *Autoimmunity* 46(5): 302-306.
- Anglim, P. P., Alonzo, T. A. and Laird-Offringa, I. A. (2008). DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol Cancer* 7: 81.
- Anglim, P. P., Galler, J. S., Koss, M. N., Hagen, J. A., Turla, S., Campan, M., et al. (2008). Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer. *Mol Cancer* 7: 62.
- Anker, P., Stroun, M. and Maurice, P. A. (1976). Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Res* 36(8): 2832-2839.
- Antonatos, D., Patsilnakos, S., Spanodimos, S., Korkonikitas, P. and Tsigas, D. (2006). Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 278-281.
- Aspinall, R. (2006). T cell development, ageing and Interleukin-7. *Mech Ageing Dev* 127(6): 572-578.
- Atamaniuk, J., Vidotto, C., Tschan, H., Bachl, N., Stuhlmeier, K. M. and Muller, M. M. (2004). Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 50(9): 1668-1670.
- Atamaniuk, J., Ruzicka, K., Stuhlmeier, K. M., Karimi, A., Eigner, M. and Mueller, M. M. (2006). Cell-free plasma DNA: a marker for apoptosis during hemodialysis. *Clin Chem* 52(3): 523-526.
- Atamaniuk, J., Kopecky, C., Skoupy, S., Saemann, M. D. and Weichhart, T. (2012). Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 27(3): 902-905.
- Bainton, D. F., Friedlander, L. M. and Shohet, S. B. (1977). Abnormalities in granule formation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 49(5): 693-704.
- Barreiro, K. and Holthofer, H. (2017). Urinary extracellular vesicles. A promising shortcut to novel biomarker discoveries. *Cell Tissue Res* 369(1): 217-227.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2): 215-233.
- Besaratinia, A. and Tommasi, S. (2013). Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. *FASEB J* 27(6): 2090-2100.

- Bharuthram, A., Paximadis, M., Picton, A. C. and Tiemessen, C. T. (2014). Comparison of a quantitative Real-Time PCR assay and droplet digital PCR for copy number analysis of the CCL4L genes. *Infect Genet Evol* 25: 28-35.
- Botezatu, I., Serdyuk, O., Potapova, G., Shelepov, V., Alechina, R., Molyaka, Y., et al. (2000). Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 46(8 Pt 1): 1078-1084.
- Branch, D. W. (1994). Thoughts on the mechanism of pregnancy loss associated with the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 3(4): 275-280.
- Brausi, M., Collette, L., Kurth, K., van der Meijden, A. P., Oosterlinck, W., Witjes, J. A., et al. (2002). Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol* 41(5): 523-531.
- Brisuda, A., Pazourkova, E., Soukup, V., Horinek, A., Hrbacek, J., Capoun, O., et al. (2016). Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer. *Urol Int* 96(1): 25-31.
- Bryzgunova, O. E., Skvortsova, T. E., Kolesnikova, E. V., Starikov, A. V., Rykova, E. Y., Vlassov, V. V., et al. (2006). Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 334-340.
- Butchbach, M. E. (2016). Applicability of digital PCR to the investigation of pediatric-onset genetic disorders. *Biomol Detect Quantif* 10: 9-14.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2999-3004.
- Cao, H., Ye, H., Sun, Z., Shen, X., Song, Z., Wu, X., et al. (2014). Circulatory mitochondrial DNA is a pro-inflammatory agent in maintenance hemodialysis patients. *PLoS One* 9(12): e113179.
- Cao, L., Cui, X., Hu, J., Li, Z., Choi, J. R., Yang, Q., et al. (2017). Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosens Bioelectron* 90: 459-474.
- Caramelli, E., Rizzo, N., Concu, M., Simonazzi, G., Carinci, P., Bondavalli, C., et al. (2003). Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction--a pilot study. *Prenat Diagn* 23(5): 367-371.
- Carp, H. J. and Shoenfeld, Y. (2007). Recurrent spontaneous abortions in antiphospholipid syndrome: natural killer cells - an additional mechanism in a multi factorial process. *Rheumatology (Oxford)* 46(10): 1517-1519.
- Carracedo, J., Ramirez, R., Pintado, O., Gomez-Villamandos, J. C., Martin-Malo, A., Rodriguez, M., et al. (1995). Cell aggregation and apoptosis induced by hemodialysis membranes. *J Am Soc Nephrol* 6(6): 1586-1591.
- Casadio, V., Calistri, D., Salvi, S., Gunelli, R., Carretta, E., Amadori, D., et al. (2013). Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study. *Biomed Res Int* 2013: 270457.
- Casadio, V., Calistri, D., Tebaldi, M., Bravaccini, S., Gunelli, R., Martorana, G., et al. (2013). Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. *Urol Oncol* 31(8): 1744-1750.
- Catto, J. W., Miah, S., Owen, H. C., Bryant, H., Myers, K., Dudzic, E., et al. (2009). Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res* 69(21): 8472-8481.

- Celec, P., Vlkova, B., Laukova, L., Babickova, J. and Boor, P. (2018). Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Rev Mol Med* 20: e1.
- Cervera, R., Serrano, R., Pons-Estel, G. J., Ceberio-Hualde, L., Shoenfeld, Y., de Ramon, E., et al. (2015). Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis* 74(6): 1011-1018.
- Cichota, L. C., Bochi, G. V., Tatsch, E., Torbitz, V. D., Agnol, P. R., Zanardo, J. C., et al. (2015). Circulating Double-Stranded DNA in Plasma of Hemodialysis Patients and its Association with Iron Stores. *Clin Lab* 61(8): 985-990.
- Clark, E. A., Silver, R. M. and Branch, D. W. (2007). Do antiphospholipid antibodies cause preeclampsia and HELLP syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 9(3): 219-225.
- Clausen, F. B., Krog, G. R., Rieneck, K., Nielsen, L. K., Lundquist, R., Finning, K., et al. (2005). Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat Diagn* 25(11): 1040-1044.
- Clausen, F. B., Damkjaer, M. B. and Dziegiel, M. H. (2014). Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfus Apher Sci* 50(2): 154-162.
- Cooper, A. C., Mikhail, A., Lethbridge, M. W., Kemeny, D. M. and Macdougall, I. C. (2003). Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol* 14(7): 1776-1784.
- Costa, J. M., Benachi, A. and Gautier, E. (2002). New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med* 346(19): 1502.
- Costa, J. M., Giovangrandi, Y., Ernault, P., Lohmann, L., Nataf, V., El Halali, N., et al. (2002). Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 119(1): 255-260.
- Daniels, G., Finning, K., Martin, P. and Soothill, P. (2004). Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 87(4): 225-232.
- Danza, A., Ruiz-Irastorza, G. and Khamashta, M. (2012). Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 26(1): 65-76.
- De Marchi, T., Foekens, J. A., Umar, A. and Martens, J. W. (2016). Endocrine therapy resistance in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer. *Drug Discov Today* 21(7): 1181-1188.
- Derksen, R. H., Khamashta, M. A. and Branch, D. W. (2004). Management of the obstetric antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 50(4): 1028-1039.
- Di Meo, A., Bartlett, J., Cheng, Y., Pasic, M. D. and Yousef, G. M. (2017). Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer* 16(1): 80.
- Diehl, F. and Diaz, L. A., Jr. (2007). Digital quantification of mutant DNA in cancer patients. *Curr Opin Oncol* 19(1): 36-42.
- do Prado, A. D., Piovesan, D. M., Staub, H. L. and Horta, B. L. (2010). Association of anticardiolipin antibodies with preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 116(6): 1433-1443.
- Dodington, D. W., Desai, H. R. and Woo, M. (2018). JAK/STAT - Emerging Players in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 29(1): 55-65.
- Dong, F., Xu, T., Shen, Y., Zhong, S., Chen, S., Ding, Q., et al. (2017). Dysregulation of miRNAs in bladder cancer: altered expression with aberrant biogenesis procedure. *Oncotarget* 8(16): 27547-27568.

- Duckitt, K. and Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 330(7491): 565.
- Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, J., Žaloudík, J. and Vyzula, R. (2005). Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. In: *Masarykova univerzita Brno* [online]. 2005 [cit. 28.2.2018]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.
- Dweep, H., Gretz, N. and Sticht, C. (2014). miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods Mol Biol* 1182: 289-305.
- Dworkin, A. M., Huang, T. H. and Toland, A. E. (2009). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol* 19(3): 165-171.
- Dyer, A. R., Greenland, P., Elliott, P., Daviglus, M. L., Claeys, G., Kesteloot, H., et al. (2004). Evaluation of measures of urinary albumin excretion in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 160(11): 1122-1131.
- El-Halawani, N., Hamed, N., Eldafrawi, M., Mourad, Z., Sorour, A. and Ghallab, O. (2014). Diagnostic and prognostic value of plasma level of microRNA-92a in acute myeloid leukemia. *American Journal of Molecular Biology* Vol.04No.01: 10.
- Esposito, A., Bardelli, A., Criscitiello, C., Colombo, N., Gelao, L., Fumagalli, L., et al. (2014). Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev* 40(5): 648-655.
- Evelyn, C. C., de la Rosette, J. J. and de Reijke, T. M. (2011). Emerging optical techniques in advanced cystoscopy for bladder cancer diagnosis: A review of the current literature. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India* 27(2): 245.
- Fan, H. C. and Quake, S. R. (2007). Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem* 79(19): 7576-7579.
- Fatouros, I. G., Destouni, A., Margonis, K., Jamurtas, A. Z., Vrettou, C., Kouretas, D., et al. (2006). Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clin Chem* 52(9): 1820-1824.
- Fayyad-Kazan, H., Bitar, N., Najjar, M., Lewalle, P., Fayyad-Kazan, M., Badran, R., et al. (2013). Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia. *J Transl Med* 11: 31.
- Feng, Y., Kang, Y., He, Y., Liu, J., Liang, B., Yang, P., et al. (2014). microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer. *BMC Urol* 14: 50.
- Flori, E., Doray, B., Gautier, E., Kohler, M., Ernault, P., Flori, J., et al. (2004). Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod* 19(3): 723-724.
- Fournie, G. J., Lule, J., Dueymes, J. M., Laval, F., Delobbe, I., Vernier, I., et al. (1989). Plasma DNA in patients undergoing hemodialysis or hemofiltration: cytolysis in artificial kidney is responsible for the release of DNA in circulation. *Am J Nephrol* 9(5): 384-391.
- Fu, L., Fu, H., Zhou, L., Xu, K., Pang, Y., Hu, K., et al. (2016). High expression of MAP7 predicts adverse prognosis in young patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Sci Rep* 6: 34546.
- Gahan, P. B. (2006). Circulating DNA: intracellular and intraorgan messenger? *Ann N Y Acad Sci* 1075: 21-33.
- Gahan, P. B. and Swaminathan, R. (2008). Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci* 1137: 1-6.
- Gahan, P. B. and Stroun, M. (2010). The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem Funct* 28(7): 529-538.

- Galbiati, S., Smid, M., Gambini, D., Ferrari, A., Restagno, G., Viora, E., et al. (2005). Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 117(2-3): 243-248.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. and Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 7(3): e30679.
- Garcia, F., Rodriguez, M. A., Goldman, M., Azcarate, M. N., Rodriguez, M. I., Muniz-Diaz, E., et al. (2015). New RHD variant alleles. *Transfusion* 55(2): 427-429.
- Garcia Moreira, V., de la Cera Martinez, T., Gago Gonzalez, E., Prieto Garcia, B. and Alvarez Menendez, F. V. (2006). Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR. *Clin Chem Lab Med* 44(12): 1410-1415.
- Ghigolea, A. B., Moldovan, R. A. and Gherman-Caprioara, M. (2015). DNA methylation: hemodialysis versus hemodiafiltration. *Ther Apher Dial* 19(2): 119-124.
- Goh, S. K., Musaffer, A., Witkowski, T., Muralidharan, V., Christophi, C., Do, H., et al. (2016). Comparison of 3 methodologies for genotyping of small deletion and insertion polymorphisms. *Clinical Chemistry* 62(7): 1012-1019.
- Gregory, T. K., Wald, D., Chen, Y., Vermaat, J. M., Xiong, Y. and Tse, W. (2009). Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol* 2: 23.
- Grootkerk-Tax, M. G., Soussan, A. A., de Haas, M., Maaskant-van Wijk, P. A. and van der Schoot, C. E. (2006). Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion* 46(12): 2142-2148.
- Haghiaci, M., Vora, N. L., Basu, S., Johnson, K. L., Presley, L., Bianchi, D. W., et al. (2012). Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring)* 20(11): 2213-2219.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D., et al. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 28(6): 655-661.
- Hanly, J. G. (2003). Antiphospholipid syndrome: an overview. *CMAJ* 168(13): 1675-1682.
- Hanson, E. K., Lubenow, H. and Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* 387(2): 303-314.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2): 297-314.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83(22): 8604-8610.
- Hocking, J., Mithraprabhu, S., Kalff, A. and Spencer, A. (2016). Liquid biopsies for liquid tumors: emerging potential of circulating free nucleic acid evaluation for the management of hematologic malignancies. *Cancer Biology and Medicine* 13(2): 215-225.
- Hoque, M. O. (2009). DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn* 9(3): 243-257.
- Horinek, A., Korabecna, M., Panczak, A., Ulcova Gallova, Z., Nouzova, K., Calda, P., et al. (2008). Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics. *Fetal Diagn Ther* 24(1): 15-21.
- Hristoskova, S., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2004). Anti-phospholipid and anti-DNA antibodies are not associated with the elevated release of circulatory fetal DNA in pregnancies affected by preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 23(3): 257-268.

- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Doucha, J., Dlouha, K. and Krofta, L. (2012). Absolute and relative quantification of placenta-specific micrnas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *J Mol Diagn* 14(2): 160-167.
- Huang da, W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4(1): 44-57.
- Huang, J. J., Yu, J., Li, J. Y., Liu, Y. T. and Zhong, R. Q. (2012). Circulating microRNA expression is associated with genetic subtype and survival of multiple myeloma. *Med Oncol* 29(4): 2402-2408.
- Huang, L., Luo, J., Cai, Q., Pan, Q., Zeng, H., Guo, Z., et al. (2011). MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *Int J Cancer* 128(8): 1758-1769.
- Hudson, R. S., Yi, M., Esposito, D., Glynn, S. A., Starks, A. M., Yang, Y., et al. (2013). MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. *Oncogene* 32(35): 4139-4147.
- Hung, E. C., Shing, T. K., Chim, S. S., Yeung, P. C., Chan, R. W., Chik, K. W., et al. (2009). Presence of donor-derived DNA and cells in the urine of sex-mismatched hematopoietic stem cell transplant recipients: implication for the transrenal hypothesis. *Clinical chemistry* 55(4): 715-722.
- Chan, F. Y., Cowley, N. M., Wolter, L., Stone, M., Carmody, F., Saul, A., et al. (2001). Prenatal RHD gene determination and dosage analysis by PCR: clinical evaluation. *Prenat Diagn* 21(4): 321-326.
- Chang, C. A., Haque, W. Z., Yoshimatsu, G., Balaji, P. S., Lawrence, M. C. and Naziruddin, B. (2016). Monitoring of beta cell replacement outcomes. *Panminerva Medica* 58(1): 59-71.
- Chang, H. W., Tsui, K. H., Shen, L. C., Huang, H. W., Wang, S. N. and Chang, P. L. (2007). Urinary cell-free DNA as a potential tumor marker for bladder cancer. *Int J Biol Markers* 22(4): 287-294.
- Chang, S. H., Reynolds, J. M., Pappu, B. P., Chen, G., Martinez, G. J. and Dong, C. (2011). Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 35(4): 611-621.
- Chung, B. H., Kim, K. W., Sun, I. O., Choi, S. R., Park, H. S., Jeon, E. J., et al. (2012). Increased interleukin-17 producing effector memory T cells in the end-stage renal disease patients. *Immunol Lett* 141(2): 181-189.
- Illanes, S., Denbow, M. L., Smith, R. P., Overton, T. G., Soothill, P. W. and Finning, K. (2006). Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine. *Prenat Diagn* 26(13): 1216-1218.
- Izzotti, A., Carozzo, S., Pulliero, A., Zhabayeva, D., Ravetti, J. L. and Bersimbaev, R. (2016). Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: Applicability in cancer diagnosis and prevention. *American Journal of Cancer Research* 6(7): 1461-1493.
- Jarry, J., Schadendorf, D., Greenwood, C., Spatz, A. and van Kempen, L. C. (2014). The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol Oncol* 8(4): 819-829.
- Jung, K., Fleischhacker, M. and Rabien, A. (2010). Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 411(21-22): 1611-1624.
- Kan, T., Sato, F., Ito, T., Matsumura, N., David, S., Cheng, Y., et al. (2009). The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim. *Gastroenterology* 136(5): 1689-1700.

- Kanasaki, K., Taduri, G. and Koya, D. (2013). Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4: 7.
- Karageyim, A. Y., Kars, B., Dansuk, R., Aygun, E., Unal, O. and Turan, M. C. (2002). Chorea gravidarum: a case report. *J Matern Fetal Neonatal Med* 12(5): 353-354.
- Kim, S. M., Kang, H. W., Kim, W. T., Kim, Y. J., Yun, S. J., Lee, S. C., et al. (2013). Cell-Free microRNA-214 From Urine as a Biomarker for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Korean J Urol* 54(11): 791-796.
- Kjersem, J. B., Ik Dahl, T., Lingjaerde, O. C., Guren, T., Tveit, K. M. and Kure, E. H. (2014). Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment. *Mol Oncol* 8(1): 59-67.
- Knowles, M. A. (2006). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis* 27(3): 361-373.
- Kolls, J. K. and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21(4): 467-476.
- Korabecna, M., Opatrna, S., Wirth, J., Rulcova, K., Eiselt, J., Sefrna, F., et al. (2008). Cell-free plasma DNA during peritoneal dialysis and hemodialysis and in patients with chronic kidney disease. *Ann N Y Acad Sci* 1137: 296-301.
- Korabecna, M., Pazourkova, E., Horinek, A., Mokrejsova, M. and Tesar, V. (2012). Alterations in methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA during a hemodialysis procedure. *Expert Opin Biol Ther* 12 Suppl 1: S27-33.
- Kramer, A., Pippias, M., Noordzij, M., Stel, V. S., Afentakis, N., Ambuhl, P. M., et al. (2018). The European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015: a summary. *Clin Kidney J* 11(1): 108-122.
- Kratochvilova, T., Holuskova, I., Durdova, V., Strasilova, P. and Lubusky, M. (2016). Klinický význam neinvazivního stanovení *RHD* a *RHCE* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgrad Med* 18(4): 362 - 369.
- Lamba, V., Ghodke-Puranik, Y., Guan, W. and Lamba, J. K. (2014). Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Res Notes* 7: 129.
- Lazar, L., Nagy, B., Ban, Z., Nagy, G. R. and Papp, Z. (2006). Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin Chem* 52(8): 1599-1601.
- Lee, T. H., Montalvo, L., Chrebtow, V. and Busch, M. P. (2001). Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 41(2): 276-282.
- Lee, Y. H. and Bae, S. C. (2016). Association between TYK2 polymorphisms and susceptibility to autoimmune rheumatic diseases: a meta-analysis. *Lupus* 25(12): 1307-1314.
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. and Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37(3): 646-650.
- Leung, T. N., Zhang, J., Lau, T. K., Hjelm, N. M. and Lo, Y. M. (1998). Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 352(9144): 1904-1905.
- Leung, T. N., Zhang, J., Lau, T. K., Chan, L. Y. and Lo, Y. M. (2001). Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 47(1): 137-139.
- Levenson, V. V. (2010). DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diagn* 10(4): 481-488.
- Levine, J. S., Branch, D. W. and Rauch, J. (2002). The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 346(10): 752-763.

- Li, Y., Zhong, X. Y., Kang, A., Troeger, C., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2003). Inability to detect cell free fetal DNA in the urine of normal pregnant women nor in those affected by preeclampsia associated HELLP syndrome. *J Soc Gynecol Investig* 10(8): 503-508.
- Lin, T., Dong, W., Huang, J., Pan, Q., Fan, X., Zhang, C., et al. (2009). MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol* 181(3): 1372-1380.
- Liu, X., Liu, X., Wu, Y., Wu, Q., Wang, Q., Yang, Z., et al. (2017). MicroRNAs in biofluids are novel tools for bladder cancer screening. *Oncotarget* 8(19): 32370-32379.
- Liu, Z., Feng, D., Gu, D., Zheng, R., Esperat, C. and Gao, W. (2017). Differentially expressed haptoglobin as a potential biomarker for type 2 diabetic mellitus in Hispanic population. *Biofactors* 43(3): 424-433.
- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., et al. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350(9076): 485-487.
- Lo, Y. M., Hjelm, N. M., Fidler, C., Sargent, I. L., Murphy, M. F., Chamberlain, P. F., et al. (1998). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 339(24): 1734-1738.
- Lo, Y. M., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., et al. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 62(4): 768-775.
- Lo, Y. M., Lau, T. K., Zhang, J., Leung, T. N., Chang, A. M., Hjelm, N. M., et al. (1999). Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 45(10): 1747-1751.
- Lo, Y. M., Leung, T. N., Tein, M. S., Sargent, I. L., Zhang, J., Lau, T. K., et al. (1999). Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45(2): 184-188.
- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M. and Hjelm, N. M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 64(1): 218-224.
- Lo, Y. M., Rainer, T. H., Chan, L. Y., Hjelm, N. M. and Cocks, R. A. (2000). Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* 46(3): 319-323.
- Lo, Y. M., Lun, F. M., Chan, K. C., Tsui, N. B., Chong, K. C., Lau, T. K., et al. (2007). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(32): 13116-13121.
- Lotan, Y. and Roehrborn, C. G. (2003). Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology* 61(1): 109-118; discussion 118.
- Lu, T. and Li, J. (2017). Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer: current insights and promising future. *Am J Cancer Res* 7(11): 2318-2332.
- Lun, F. M., Chiu, R. W., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K. and Lo, Y. M. (2008). Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 54(10): 1664-1672.
- Luo, X., Keller, M. A., James, I., Grant, M., Liu, S., Massey, K. S., et al. (2018). Strategies to identify candidates for D variant genotyping. *Blood Transfus* 16(3): 293-301.
- Mahdavinezhad, A., Mousavi-Bahar, S. H., Poorolajal, J., Yadegarazari, R., Jafari, M., Shabab, N., et al. (2015). Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b Expression and Clinicopathological Features of Bladder Cancer. *Int J Mol Cell Med* 4(1): 32-39.
- Mahdavinezhad, A., Mousavibahar, S. H., Poorolajal, J., Yadegarazari, R., Jafari, M., Shabab, N., et al. (2015). Association between tissue miR-141, miR-200c and miR-30b and bladder cancer: a matched case-control study. *Urol J* 12(1): 2010-2013.

- Majer, S., Bauer, M., Magnet, E., Strele, A., Giegerl, E., Eder, M., et al. (2007). Maternal urine for prenatal diagnosis--an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenat Diagn* 27(13): 1219-1223.
- Mandel, P. and Metais, P. (1948). Les acides du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 142(3-4): 241-243.
- Mari, G., Deter, R. L., Carpenter, R. L., Rahman, F., Zimmerman, R., Moise, K. J., Jr., et al. (2000). Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 342(1): 9-14.
- Marroqui, L., Dos Santos, R. S., Floyel, T., Grieco, F. A., Santin, I., Op de Beeck, A., et al. (2015). TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic beta-Cells. *Diabetes* 64(11): 3808-3817.
- Matsuo, T., Miyata, Y., Mitsunari, K., Yasuda, T., Ohba, K. and Sakai, H. (2017). Pathological significance and prognostic implications of heme oxygenase 1 expression in non-muscle-invasive bladder cancer: Correlation with cell proliferation, angiogenesis, lymphangiogenesis and expression of VEGFs and COX-2. *Oncol Lett* 13(1): 275-280.
- Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., et al. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4(2): 295-306.
- Mullarky, I. K., Szaba, F. M., Kummer, L. W., Wilhelm, L. B., Parent, M. A., Johnson, L. L., et al. (2007). Gamma interferon suppresses erythropoiesis via interleukin-15. *Infect Immun* 75(5): 2630-2633.
- Muller, H. and Brenner, H. (2006). Urine markers as possible tools for prostate cancer screening: review of performance characteristics and practicality. *Clin Chem* 52(4): 562-573.
- Nahar, N., Shah, H., Siu, J., Colvin, R., Bhaskaran, M., Ranjan, R., et al. (2001). Dialysis membrane-induced neutrophil apoptosis is mediated through free radicals. *Clin Nephrol* 56(1): 52-59.
- National-Kidney-Foundation (2001). NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease, 2000. *Am J Kidney Dis* 37(1): S182-S238.
- Oepkes, D., Seaward, P. G., Vandenbussche, F. P., Windrim, R., Kingdom, J., Beyene, J., et al. (2006). Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. *N Engl J Med* 355(2): 156-164.
- Oshiro, B. T., Silver, R. M., Scott, J. R., Yu, H. and Branch, D. W. (1996). Antiphospholipid antibodies and fetal death. *Obstet Gynecol* 87(4): 489-493.
- Owens, C. L., VandenBussche, C. J., Burroughs, F. H. and Rosenthal, D. L. (2013). A review of reporting systems and terminology for urine cytology. *Cancer cytopathology* 121(1): 9-14.
- Pazourkova, E., Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Brisuda, A., Soukup, V., et al. (2016). Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs. *Adv Exp Med Biol* 924: 97-100.
- Peng, M., Chen, C., Hulbert, A., Brock, M. V. and Yu, F. (2017). Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget* 8(40): 69162-69173.
- Peters, D. L. and Pretorius, P. J. (2011). Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta* 412(11-12): 806-811.

- Pignot, G., Cizeron-Clairac, G., Vacher, S., Susini, A., Tozlu, S., Vieillefond, A., et al. (2013). microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 132(11): 2479-2491.
- Pop-Bica, C., Gulei, D., Cojocneanu-Petric, R., Braicu, C., Petrut, B. and Berindan-Neagoe, I. (2017). Understanding the Role of Non-Coding RNAs in Bladder Cancer: From Dark Matter to Valuable Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 18(7).
- Rainer, T. H. and Lam, N. Y. (2006). Circulating nucleic acids and critical illness. *Ann N Y Acad Sci* 1075: 271-277.
- Reid, G., Kirschner, M. B. and van Zandwijk, N. (2011). Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 80(2): 193-208.
- Ren, M., Lin, H., Chen, S., Yang, M., An, W., Wang, Y., et al. (2018). Detection of pseudorabies virus by duplex droplet digital PCR assay. *J Vet Diagn Invest* 30(1): 105-112.
- Rouprêt, M., Babjuk, M., Compérat, E., Zigeuner, R., Sylvester, R. J., Burger, M., et al. (2018). European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *European urology* 73(1): 111-122.
- Rumore, P., Muralidhar, B., Lin, M., Lai, C. and Steinman, C. R. (1992). Haemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance. *Clin Exp Immunol* 90(1): 56-62.
- Saad, A., Hanbury, D. C., McNicholas, T. A., Boustead, G. B., Morgan, S. and Woodman, A. C. (2002). A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine. *BJU Int* 89(4): 369-373.
- Salvi, S., Gurioli, G., Martignano, F., Foca, F., Gunelli, R., Cicchetti, G., et al. (2015). Urine Cell-Free DNA Integrity Analysis for Early Detection of Prostate Cancer Patients. *Dis Markers* 2015: 574120.
- Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J. and Foy, C. A. (2011). Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem* 83(17): 6474-6484.
- Santovito, D., De Nardis, V., Marcantonio, P., Mandolini, C., Paganelli, C., Vitale, E., et al. (2014). Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab* 99(9): E1681-1685.
- Sekizawa, A., Jimbo, M., Saito, H., Iwasaki, M., Sugito, Y., Yukimoto, Y., et al. (2002). Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 48(2): 353-354.
- Selmi, C. (2015). Autoimmunity in 2014. *Clin Rev Allergy Immunol* 49(2): 93-99.
- Setijono, S. R., Kwon, H. Y. and Song, S. J. (2017). MicroRNA, an Antisense RNA, in Sensing Myeloid Malignancies. *Front Oncol* 7: 331.
- Shoenfeld, Y., Carp, H. J., Molina, V., Blank, M., Cervera, R., Balasch, J., et al. (2006). Autoantibodies and prediction of reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* 56(5-6): 337-344.
- Schmitz-Drager, B. J., Droller, M., Lokeshwar, V. B., Lotan, Y., Hudson, M. A., van Rhijn, B. W., et al. (2015). Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/ICUD consensus. *Urol Int* 94(1): 1-24.
- Schreiber, K., Sciascia, S., de Groot, P. G., Devreese, K., Jacobsen, S., Ruiz-Irastroza, G., et al. (2018). Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 4: 17103.
- Silva, S. S., Lopes, C., Teixeira, A. L., Carneiro de Sousa, M. J. and Medeiros, R. (2015). Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet* 14: 1-10.

- Silver, R. M., Parker, C. B., Reddy, U. M., Goldenberg, R., Coustan, D., Dudley, D. J., et al. (2013). Antiphospholipid antibodies in stillbirth. *Obstet Gynecol* 122(3): 641-657.
- Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Cassileth, P. A., Harrington, D. H., Theil, K. S., Mohamed, A., et al. (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96(13): 4075-4083.
- Smith, D. A., Newbury, L. J., Drago, G., Bowen, T. and Redman, J. E. (2017). Electrochemical detection of urinary microRNAs via sulfonamide-bound antisense hybridisation. *Sens Actuators B Chem* 253: 335-341.
- Snowdon, J., Boag, S., Feilotter, H., Izard, J. and Siemens, D. R. (2013). A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Can Urol Assoc J* 7(1-2): 28-32.
- Son, G. H., Chung, S. and Kim, K. (2011). The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front Neuroendocrinol* 32(4): 451-465.
- Sorenson, G. D., Pribish, D. M., Valone, F. H., Memoli, V. A., Bzik, D. J. and Yao, S. L. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3(1): 67-71.
- Soukup, V., Kalousova, M., Capoun, O., Sobotka, R., Breyt, Z., Pesl, M., et al. (2015). Panel of Urinary Diagnostic Markers for Non-Invasive Detection of Primary and Recurrent Urothelial Urinary Bladder Carcinoma. *Urol Int* 95(1): 56-64.
- Springer, D., Loucký, J., Gregor, V., Macek, M. and Zima, T. (2018). Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství. In: *cskb.cz* [online]. 10.4.2018 [cit. 31.5.2018]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/>.
- Stamatiou, K., Moschouris, H., Papadaki, M., Perlepes, G. and Skolarikos, A. (2011). Accuracy of modern ultrasonographic techniques in the follow up of patients with superficial bladder carcinoma. *Med Ultrason* 13(2): 114-119.
- Steinman, C. R. (1975). Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest* 56(2): 512-515.
- Streleckiene, G., Reid, H. M., Arnold, N., Bauerschlag, D. and Forster, M. (2018). Quantifying cell free DNA in urine: comparison between commercial kits, impact of gender and inter-individual variation. *Biotechniques* 64(5): 225-230.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46(5): 318-322.
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. and Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 313(1-2): 139-142.
- Swinkels, D. W., de Kok, J. B., Hendriks, J. C., Wiegerinck, E., Zusterzeel, P. L. and Steegers, E. A. (2002). Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 48(4): 650-653.
- Tabor, A., Vestergaard, C. H. and Lidegaard, O. (2009). Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 34(1): 19-24.
- Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I. and Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 45(11): 1732-1740.

- Tan, W. S., Tan, W. P., Tan, M. Y., Khetrpal, P., Dong, L., deWinter, P., et al. (2018). Novel urinary biomarkers for the detection of bladder cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev* 69: 39-52.
- Tanaka, M., Oikawa, K., Takanashi, M., Kudo, M., Ohyashiki, J., Ohyashiki, K., et al. (2009). Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 4(5): e5532.
- Tefferi, A., Thiele, J. and Vardiman, J. W. (2009). The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 115(17): 3842-3847.
- Tempfer, C. B., Kurz, C., Bentz, E. K., Unfried, G., Walch, K., Czizek, U., et al. (2006). A combination treatment of prednisone, aspirin, folate, and progesterone in women with idiopathic recurrent miscarriage: a matched-pair study. *Fertil Steril* 86(1): 145-148.
- Torres, A., Torres, K., Pesci, A., Ceccaroni, M., Paszkowski, T., Cassandrini, P., et al. (2012). Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer* 12: 369.
- Truong, M., Yang, B. and Jarrard, D. F. (2013). Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis. *J Urol* 189(2): 422-429.
- Tsui, N. B., Hyland, C. A., Gardener, G. J., Danon, D., Fisk, N. M., Millard, G., et al. (2013). Noninvasive fetal RHD genotyping by microfluidics digital PCR using maternal plasma from two alloimmunized women with the variant RHD(IVS3+1G>A) allele. *Prenat Diagn* 33(12): 1214-1216.
- Ulcova-Gallova, Z. (2005). Antiphospholipid antibodies and reproductive failure. *Chem Immunol Allergy* 88: 139-149.
- Urbaniak, S. J. and Greiss, M. A. (2000). RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev* 14(1): 44-61.
- Urduingio, R. G., Sanchez-Mut, J. V. and Esteller, M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 8(11): 1056-1072.
- Visser, O., Trama, A., Maynadie, M., Stiller, C., Marcos-Gragera, R., De Angelis, R., et al. (2012). Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *Eur J Cancer* 48(17): 3257-3266.
- Vivanti, A., Benachi, A., Huchet, F. X., Ville, Y., Cohen, H. and Costa, J. M. (2016). Diagnostic accuracy of fetal rhesus D genotyping using cell-free fetal DNA during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 215(5): 606 e601-606 e605.
- Vogl, C., Flatt, T., Fuhrmann, B., Hofmann, E., Wallner, B., Stiefvater, R., et al. (2010). Transcriptome analysis reveals a major impact of JAK protein tyrosine kinase 2 (Tyk2) on the expression of interferon-responsive and metabolic genes. *BMC Genomics* 11: 199.
- Wagner, F. F., Frohmayer, A. and Flegel, W. A. (2001). RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2: 10.
- Wallace, J. A. and O'Connell, R. M. (2017). MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts. *Blood* 130(11): 1290-1301.
- Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K. and Oliphant, A. (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 33(7): 662-666.
- Wang, H. W., Lo, H. H., Chiu, Y. L., Chang, S. J., Huang, P. H., Liao, K. H., et al. (2014). Dysregulated miR-361-5p/VEGF axis in the plasma and endothelial progenitor cells of patients with coronary artery disease. *PLoS One* 9(5): e98070.

- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J. H., McClarty, S., Baxter, D. and Galas, D. J. (2012). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 7(7): e41561.
- Wang, R., Wu, Y., Huang, W. and Chen, W. (2018). MicroRNA-940 Targets INPP4A or GSK3beta and Activates the Wnt/beta-Catenin Pathway to Regulate the Malignant Behavior of Bladder Cancer Cells. *Oncol Res* 26(1): 145-155.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., et al. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56(11): 1733-1741.
- Wei, S., Bing, Z., Yao, Y., Master, S. R. and Gupta, P. (2015). Higher Expression of miR-182 in Cytology Specimens of High-Grade Urothelial Cell Carcinoma: A Potential Diagnostic Marker. *Acta Cytol* 59(1): 109-112.
- Wieczorek, E. and Reszka, E. (2018). mRNA, microRNA and lncRNA as novel bladder tumor markers. *Clin Chim Acta* 477: 141-153.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75(5): 855-862.
- Wilson, W. A., Gharavi, A. E., Koike, T., Lockshin, M. D., Branch, D. W., Piette, J. C., et al. (1999). International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 42(7): 1309-1311.
- Witjes, J. A., Comp  rat, E., Cowan, N. C., De Santis, M., Gakis, G., Lebre  t, T., et al. (2014). EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *European urology* 65(4): 778-792.
- Witte, A. K., Fister, S., Mester, P., Schoder, D. and Rossmanith, P. (2016). Evaluation of the performance of quantitative detection of the *Listeria monocytogenes* *prfA* locus with droplet digital PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(27): 7583-7593.
- Wszolek, M. F., Rieger-Christ, K. M., Kenney, P. A., Gould, J. J., Silva Neto, B., Lavoie, A. K., et al. (2011). A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urol Oncol* 29(6): 794-801 e791.
- Wu, D., Ni, J., Beretov, J., Cozzi, P., Willcox, M., Wasinger, V., et al. (2017). Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 118: 15-26.
- Yamada, H., Atsumi, T., Kobashi, G., Ota, C., Kato, E. H., Tsuruga, N., et al. (2009). Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol* 79(2): 188-195.
- Yamada, Y., Enokida, H., Kojima, S., Kawakami, K., Chiyomaru, T., Tatarano, S., et al. (2011). MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci* 102(3): 522-529.
- Yamaguchi, Y., Fujio, K., Shoda, H., Okamoto, A., Tsuno, N. H., Takahashi, K., et al. (2007). IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol* 179(10): 7128-7136.
- Yoshino, H., Chiyomaru, T., Enokida, H., Kawakami, K., Tatarano, S., Nishiyama, K., et al. (2011). The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 104(5): 808-818.
- Yun, S. J., Jeong, P., Kim, W. T., Kim, T. H., Lee, Y. S., Song, P. H., et al. (2012). Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int J Oncol* 41(5): 1871-1878.
- Zancan, M., Franceschini, R., Mimmo, C., Vianello, M., Di Tonno, F., Mazzariol, C., et al. (2005). Free DNA in urine: a new marker for bladder cancer? Preliminary data. *Int J Biol Markers* 20(2): 134-136.

- Zancan, M., Galdi, F., Di Tonno, F., Mazzariol, C., Orlando, C., Malentacchi, F., et al. (2009). Evaluation of cell-free DNA in urine as a marker for bladder cancer diagnosis. *Int J Biol Markers* 24(3): 147-155.
- Zaporozhchenko, I. A., Bryzgunova, O. E., Lekchnov, E. A., Osipov, I. D., Zaripov, M. M., Yurchenko, Y. B., et al. (2018). [Representation analysis of miRNA from clarified urine and urine microvesicles in prostate malignancies and non-malignant neoplasms]. *Biomed Khim* 64(1): 38-45.
- Zeybek, Y. G., Gunel, T., Benian, A., Aydinli, K. and Kaleli, S. (2013). Clinical evaluations of cell-free fetal DNA quantities in pre-eclamptic pregnancies. *J Obstet Gynaecol Res* 39(3): 632-640.
- Zhang, D. Z., Lau, K. M., Chan, E. S., Wang, G., Szeto, C. C., Wong, K., et al. (2014). Cell-free urinary microRNA-99a and microRNA-125b are diagnostic markers for the non-invasive screening of bladder cancer. *PLoS One* 9(7): e100793.
- Zhao, B. S., Liu, S. G., Wang, T. Y., Ji, Y. H., Qi, B., Tao, Y. P., et al. (2013). Screening of microRNA in patients with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with different prognoses. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(1): 139-143.
- Zhong, X. Y., Holzgreve, W., Li, J. C., Aydinli, K. and Hahn, S. (2000). High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn* 20(10): 838-841.
- Zhong, X. Y., Hahn, D., Troeger, C., Klemm, A., Stein, G., Thomson, P., et al. (2001). Cell-free DNA in urine: a marker for kidney graft rejection, but not for prenatal diagnosis? *Ann N Y Acad Sci* 945: 250-257.
- Zhong, X. Y., Laivuori, H., Livingston, J. C., Ylikorkala, O., Sibai, B. M., Holzgreve, W., et al. (2001). Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184(3): 414-419.
- Zhou, H., Tang, K., Xiao, H., Zeng, J., Guan, W., Guo, X., et al. (2015). A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 34: 53.
- Zhou, X., Zhang, X., Yang, Y., Li, Z., Du, L., Dong, Z., et al. (2014). Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Med Oncol* 31(10): 197.
- Ziegler, A., Zangemeister-Wittke, U. and Stahel, R. A. (2002). Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 28(5): 255-271.
- Zimmermann, B. G., Grill, S., Holzgreve, W., Zhong, X. Y., Jackson, L. G. and Hahn, S. (2008). Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn* 28(12): 1087-1093.

8 Seznam zkratek

AFP	alfa-fetoprotein
AMC	odběr plodové vody
AML	akutní myeloidní leukémie
APA	antifosfolipidové protilátky
APP	amyloidový prekurzorový protein
APS	antifosfolipidový syndrom
AUC	area under the curve
beta-hCG	beta-podjednotka lidského choriogonadotropinu
cfDNA	cell free DNA, volná DNA
cffDNA	cell-free fetal DNA, fetální volná DNA
cfNA	cell-free nucleic acid, volná nukleová kyselina
CIS	carcinoma in situ
CMP	cévní mozková příhoda
CNV	copy number variation
CT	threshold cycle
CVS	odběr choriových klků
ddPCR	droplet digital PCR
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DM	diabetes mellitus
DS	Downův syndrom
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FSGS	fokálně segmentální glomeruloskleróza
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza
GE	genomický ekvivalent
GIT	gastrointestinální trakt
GT	gestační týden
HD	hemodialýza

HELLP syndrom	syndrom zahrnující hemolýzu, zvýšené hladiny jaterních enzymů a nízký počet krevních destiček (hemolysis, elevated liver enzyme, low platelets)
HG	high grade
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL-6	interleukin 6
IL-6R	receptor pro interleukin 6
IL-6ST	interleukin 6 signal transducer
IL-7	interleukin7
IL-13	interleukin 13
IL-13RA1	alfa 1 podjednotka receptoru pro interleukin 13
IL-15	interleukin 15
IL-17C	interleukin 17C
INHA	inhibin A
LG	low grade
lncRNA	long non-coding RNA, dlouhá nekódující RNA
MAP	mitogen-activated protein, mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCD	nemoc minimálních změn glomerulů, minimal change disease
MGN	membranózní glomerulonefritida
miRNA	mikroRNA
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA
NA	nucleic acid, nukleová kyselina
NGS	next-generation sequencing
NIPT	neinvazivní prenatální testování
PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A
PCR	polymerázová řetězová reakce
PLGF	placentární růstový faktor
PSA	prostatický specifický antigen

qPCR	kvantitativní PCR, real-time PCR
RARBeta2	retinoic acid receptor beta2
RASSF1A	RAS associated domain-containing protein 1A
<i>RHCE</i>	gen pro antigeny C a E krevní skupiny Rh
RhD	antigen D krevní skupiny Rh
<i>RHD</i> Ψ	pseudogen <i>RHD</i>
RNA	ribonukleová kyselina
ROC křivka	receiver operating characteristic curve
SLE	systémový lupus erythematoses
snoRNA	small nucleolar RNA, malá jadérková RNA
snRNA	small nuclear RNA, malá jaderná RNA
SRY	sex-determinující faktor Y
ST	syncytiotrofoblast
Th lymfocyt	helper T lymfocyt, pomocný T lymfocyt
TNM	systém klasifikace nádorů (tumor, nodus, metastázy)
TURB	transuretrální resekce močového měchýře
TYK2	tyrozinkináza 2
ucfDNA	urinary cell free DNA, volná DNA v moči
UZ	ultrazvuk
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

9 Seznam publikací autorky

Publikace použité při přípravě této práce

- Brisuda, A., **Pazourkova, E.**, Soukup, V., Horinek, A., Hrbacek, J., Capoun, O., et al. (2016). Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer. *Urol Int* 96, 25-31. IF 1,611. **AP 30%**
- Korabecna, M., **Pazourkova, E.**, Horinek, A., Mokrejsova, M., and Tesar, V. (2012). Alterations in methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA during a hemodialysis procedure. *Expert opinion on biological therapy* 12 Suppl 1, S27-33. IF 3,345. **AP 30%**
- Korabecna, M., **Pazourkova, E.**, Horinek, A., Mokrejsova, M., and Tesar, V. (2013). Methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA differs in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy according to the intensity of anemia therapy. *Blood purification* 36, 280-286. IF 1,92. **AP 30%**
- Korabecna, M., **Pazourkova, E.**, Horinek, A., Rocinova, K., and Tesar, V. (2013). Cell-free nucleic acids as biomarkers in dialyzed patients. *Journal of nephrology* 26, 1001-1008. IF 2,015. **AP 20%**
- Korabecna, M., Ulcova-Gallova, Z., Horinek, A., **Pazourkova, E.**, and Calda, P. (2014). Quantification of circulating fetal DNA as a tool for potential monitoring of pregnant patients with antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity* 47, 473-477. IF 2,714. **AP 20%**
- Koutova, L., Sterbova, M., **Pazourkova, E.**, Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Lysak, D. and Korabecna, M. (2015). The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients. *Leukemia research* 39, 1389-1395. IF 2,606. **AP 15%**
- Pazourkova, E.**, Pospisilova, S., Svobodova, I., Horinek, A., Brisuda, A., Soukup, V., Hrbacek, J., Capoun, O., Mares, J., Hanus, T., et al. (2016). Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs. *Adv Exp Med Biol* 924, 97-100. IF 1,881. **AP 40%**
- Pospisilova, S., **Pazourkova, E.**, Horinek, A., Brisuda, A., Svobodova, I., Soukup, V., Hrbacek, J., Capoun, O., Hanus, T., Mares, J., et al. (2016). MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection. *Neoplasma* 63, 799-808. IF 1,871. **AP 10%**
- Svobodova, I., **Pazourkova, E.**, Horinek, A., Novotna, M., Calda, P., and Korabecna, M. (2015). Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping - Comparison with a Routine Real-Time PCR Based Approach. *PloS one* 10, e0142572. IF 4,411. **AP 30%**

Ostatní publikace

- Skrha, P., Horinek, A., **Pazourkova, E.**, Hajer, J., Fric, P., Skrha, J., and Andel, M. (2016). Serum microRNA-196 and microRNA-200 in pancreatic ductal adenocarcinoma of patients with diabetes mellitus. *Pancreatology* 16, 839-843. IF 2,724.
- Svobodova, I., Korabecna, M., Calda, P., Brestak, M., **Pazourkova, E.**, Pospisilova, S., Krkavcova, M., Novotna, M., and Horinek, A. (2016). Differentially expressed miRNAs in trisomy 21 placentas. *Prenatal diagnosis* 36, 775-784. IF 2,523.

Potvrzuji výše uvedené autorské podíly (AP) MUDr. Evy Pazourkové na výše uvedených studiích.

V Praze dne 2. 7. 2018

Doc. RNDr. Marie Korabečná, PhD